EINFLUSS VON WUCHSSTOFFEN AUF DIE REGENERATION AN BLATTSTÜCKEN VON BEGONIA REX PUTZEY

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ernst Münzel

aus

Berlin-Nikolassee

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546510_0033

EINFLUSS VON WUCHSSTOFFEN AUF DIE REGENERATION AN BLATTSTÜCKEN VON BEGONIA REX PUTZEY

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ernst Münzel

aus

Berlin-Nikolassee

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof. Dr. J. Reinert

2. Referent: Prof. Dr. Th. Eckert

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.1969

Tag der Promotion: 9. FEB. 1970

INHALT

Seite

Einleitung 4

Material 6

Methode 6

Ergebnisse 10

Einfluß von Nährsalzen und Außenfaktoren auf das Versuchsmaterial 10

Morphologische Veränderungen der Regeneration durch Wuchsstoffe (Gibberellinsäure, β-Indolylessigsäure, Kinetin, Fluorenol) 11

Anatomische Veränderungen durch Wuchsstoffe (Gibberellinsäure, β-Indolylessigsäure, Kinetin) .. 22

Ursachen der Regenerationshemmung durch Gibberellinsäure 29

Diskussion 34

Zusammenfassung 56

Literatur 58

EINLEITUNG

Begonienblätter sind wegen ihrer ausgeprägten Fähigkeit zur Bildung von Sproß- und Wurzelregeneraten für Regenerationsversuche ganz besonders geeignet. Sie sind deshalb klassisches Untersuchungsobjekt, auf das viele Autoren immer wieder zurückgegriffen haben. Daher spricht schon SACHS(1892) von „Regeneration in bekannter Weise" (vgl. Literaturübersicht bei LENSKI 1958 und WIRTH 1960).

Zahlreiche Substanzen, vor allem Wuchshormone, fördern oder hemmen diese Regeneratbildung (PREVOT 1938, 1948, 1965, 1967a, 1967b, PREVOT und ARNASON 1966, PREVOT und CHLYAH 1968, CHLYAH-ARNASON und TRAN THAN VAN 1968, BIGOT 1966, BIGOT und NITSCH 1968; - SCHRAUDOLF und REINERT 1959, SCHOTT und SCHRAUDOLF 1967, REINERT und BESEMER 1967; - WIRTH 1960).

Die Arbeiten von SCHRAUDOLF und REINERT(1959), sowie von REINERT und BESEMER(1967) weiterführend, untersucht auch die vorliegende Arbeit den Einfluß von Wuchsstoffen auf die Sproß- und Wurzelbildung an Blattstücken von Begonia rex. Einerseits sollten die physiologischen Bedingungen der Regeneration festgestellt, andererseits die biochemischen Wirkungsmechanismen von Wuchsstoffen erforscht werden. Hierbei war insbesondere die Ursache der auffälligen Hemmung von Sproß- und Wurzelregeneration durch Gibberellinsäure zu klären.

Der erste Teil der Arbeit stellt die durch Wuchsstoffe (Gibberellinsäure, β-Indolylessigsäure, Kinetin, Fluorenol) hervorgerufenen morphologischen Veränderungen fest (Hemmung oder Förderung der Sproß- und Wurzelbildung, Teratombildungen, Auftreten von Regeneraten auf der ganzen Blattfläche, Kallusbildung).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der anatomische Ablauf der Regeneration verfolgt, um das anatomische Bild der bei Wuchsstoffzusatz auftretenden morphologischen Erscheinungen zu klären. Solche anatomischen Untersuchungen der Wuchsstoffeffekte sind - obwohl eigentlich naheliegend - an Begonienblättern bisher nicht durchgeführt worden.

Allerdings hat bereits REGEL(1876) den unbeeinflußten Verlauf der Regeneration anatomisch beschrieben. Seine Untersuchungen haben später HANSEN(1881), van THIEGEM und DOULIOT(1888), HARTSEMA(1926), sowie PREVOT(1948) fortgeführt und ergänzt. Doch liefert auch die vorliegende Arbeit noch Beiträge zu strittigen Punkten, insbesondere zur Frage der Stärkeanhäufung vor der Regeneration.

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem biochemischen Ablauf der durch Gibberellinsäure hervorgerufenen Hemmung der Sproß- und Wurzelbildung. Der Einfluß von Gibberellinsäure auf die Photosynthese und die Amylaseaktivität wurde überprüft, da auf Grund der anatomischen Befunde ein solcher Einfluß wahrscheinlich war. Die Messung der Amylaseaktivität erfolgte mit einer neuen, eigenen Arbeitsmethode. Damit verlagerten sich die Untersuchungen aus dem morphologisch-anatomischen Bereich in den Problemkreis biochemischer Reaktionsabläufe.

MATERIAL

Zur Anzucht diente Samenmaterial der Firma Benary Begonia rex Putzey, Spielarten(Bestellnummer C 010/28 485).

Von den benutzten Substanzen stammte Agar-Agar(Spezial Noble-Agar) von der Firma Difco(Detroit, USA), Gibberellinsäure(GA_3) von der Firma C.Roth(Karlsruhe), Kinetin von der Firma Serva (Heidelberg), das Einbettungsmittel „Eukitt" von der Firma O.Kindler(Freiburg im Breisgau), ^{14}C-markiertes Natriumbikarbonat vom Radiochemical Center(Amersham). Die benötigte radioaktive Stärke fiel als Nebenprodukt der Photosyntheseversuche an. Dr.MOHR von der Firma E.Merck (Darmstadt) stellte dankenswerterweise 9-Hydroxyfluoren-carbonsäure(Fluorenol) zur Verfügung. β-Indolylessigsäure(IES), Saccharose und die Nährsalze waren p.a.-Chemikalien der Firma E.Merck(Darmstadt).

Für die Photosynthese-Versuche wurden Warburg-Gefäße der Firma B.Braun(Melsungen) benutzt und zwar Modell A 05-29a (Quaderförmiges Reaktionsgefäß, 16 ml Volumen, seitlicher Einfülltubus zusätzlich mit Ansatzbirne und Schlauchventil).

METHODE

Als Grundmedium dienten die Salze nach WHITE(1954), jedoch FeEdta an Stelle von $Fe_2(SO_4)_3$ mit Zusatz von 2% Saccharose, 0,8% Agar, je 10ml pro Kulturröhrchen. Anfangs sind auch die Nährsalzlösung nach HELLER(1953) und verschiedene Saccharose-Konzentrationen erprobt worden.

Durch Erhitzen im Autoklaven (120°C, 1 atü, 20 Minuten) ließen sich sterilisieren: Nährlösungen ohne Wuchsstoffzusatz, Nährlösungen mit IES oder Kinetin, Wasser und n/50 Natronlauge zum Auflösen hitzelabiler Substanzen(Fluorenol, GA_3), sowie benötigte Arbeitsgeräte. Hingegen mußten GA_3 und Fluorenol, da hitzelabil (HENDERSON 1960, LORENZEN 1969), sowie die Begoniensamen durch Übergießen mit Äther von anhaftenden Keimen befreit werden.

Die hitzestabilen Substanzen Kinetin und IES konnten dem Nährboden vor dem Sterilisieren zugegeben werden. Von GA_3 und Fluorenol wurden nach der Ätherbehandlung sterile Stammlösungen hergestellt und dem warmen, noch flüssigen Nährboden nach der Sterilisation zugesetzt. Fluorenol, in Wasser praktisch unlöslich, ließ sich mit äquimolaren Mengen sterilisierter n/50-Natronlauge als Natriumsalz in Lösung bringen. Für die Stammlösung der Konzentration 10^{-4}g/ml müssen 9,3mg Fluorenol in 2,0ml n/50 NaOH gelöst und mit Wasser zu 100 ml ergänzt werden.

Die Außenfaktoren der Versuche (Licht, Temperatur) konnten nicht variiert werden, da in denselben Kulturräumen zeitweilig auch andere Versuche durchgeführt wurden. Sie waren auf 24°C(±1°C, nachts 1-2°C niedriger) und zwölfstündigem Licht/Dunkelwechsel (3000 Lux) festgelegt. Zur Anzucht von Versuchspflanzen dienten gelegentlich auch andere Kulturräume mit geringfügig abweichenden Außenbedingungen (20-26°C, 2000-4000 Lux).

Aussaat der Samen und Versuchsansätze wurden unter aseptischen Bedingungen in der Impfkabine durchgeführt. Neben der Samenaussaat erfolgte die Anzucht von Blattmaterial auch durch Regeneration an steril kultivierten Blattstücken. Hierzu dienten Blätter, die bei Versuchsansätzen übrig blieben, weil sie zu groß oder zu klein waren.

Etwa zwölf Wochen alte, 2-3 cm^2 große Blätter, am Spreitengrund gerade abgeschnitten, wurden auf Nährboden mit oder ohne(Kontrolle) Zusatz von Wuchsstoffen dorsal aufgelegt kultiviert, jeweils 15 Blätter pro Wuchsstoffkonzentration. Nach 30 Tagen erfolgte Auszählung der Sproß- und Wurzelregenerate. Unberücksichtigt blieben ganz kleine Regenerathöckerchen, die nicht eindeutig als Sprosse oder Wurzeln identifiziert werden konnten.

Alle Versuche sind mindestens zweimal reproduziert worden. Überprüfung der Signifikanz quantitativer Differenzen erfolgte durch den t-Test nach PÄTAU(1943).

Zur Überprüfung des anatomischen Ablaufs der Regeneration wurden aus Kulturansätzen ohne bzw. mit $5 \cdot 10^{-7}$ g/ml GA_3 drei Wochen lang alle zwei Tage je vier Blätter entnommen, mit Navashin-Lösung fixiert, in Paraffin eingebettet und mit dem Mikrotom geschnitten (Schnittdicke 15µ, Anfärbung der Schnitte durch Eosin-Lichtgrün, Einbettung in „Eukitt", Fixier- und Färbemethoden nach JENSEN 1962).

Daneben sind von Blättern der Kinetin und IES-Versuche nach Auszählung der Regenerate Handschnitte angefertigt worden, die zum Photographieren allerdings ungeeignet waren. Zwar konnte dabei nur das Endstadium der Regeneration nach 30 Tagen beurteilt werden, doch ließen sich daraus Rückschlüsse auf den Verlauf der Regeneratbildung ziehen.

Der anatomische Befund machte eine Bestimmung der Photosynthese und der Amylaseaktivität notwendig. Sie erfolgte 1,2,3,5,7 und 9 Tage nach Versuchsansatz jeweils aus fünf Blattpaaren, die paarweise von der selben Pflanze stammten und ohne bzw. mit 10^{-6} g/ml Gibberellinsäure kultiviert worden waren.

Für die Photosyntheseversuche dienten als Reaktionsgefäße die oben beschriebenen quaderförmigen Warburg-Tröge. In ein solches Gefäß (mit 0,1ml Wasser befeuchtet) konnten jeweils 1-2 Blattpaare (mit und ohne Gibberellinsäure kultiviert) dorsal hineingelegt werden. Nach Verschluß der mittleren Öffnung wurde die Ansatzbirne mit 200µl radioaktiver Natriumbikarbonatlösung (5µCu/ml) beschickt und durch Aufsetzten des Schlauchventils abgesperrt. Über die dritte Öffnung wurde eine Schlauchverbindung zu einer Wasserstrahlpumpe hergestellt und damit ein Unterdruck an das Gefäß angelegt. Nach Abklemmen des Schlauchs war das System geschlossen. Nach Füllen des Schlauchventils mit Perchlorsäure und vorsichtigem Öffnen des Ventils saugte sich die Säure durch den Unterdruck in die Ansatzbirne mit der Bikarbonatlösung hinein. Das aus der Lösung freigesetzte Kohlendioxyd verteilte sich infolge des Unterdrucks gleichmäßig im Reaktionsgefäß.

Nach Druckausgleich durch kurzes Öffnen des Ventils erhielten die Blätter 30 Minuten lang bei 18°C eine Lichtintensität von 4000 Lux. Das bei Versuchsende nicht verbrauchte, radioaktive Kohlendioxyd ließ sich durch Absaugen in Kalilauge entfernen.

Aus den Blättern wurde je ein $1cm^2$ großes Stück herausgeschnitten, mit 1ml Wasser homogenisiert, das Homogenisat unter Zusatz von 4ml absolutem Alkohol eine Minute lang im Wasserbad bei 95°C erhitzt, unter Nachspülen mit zweimal 2ml 80% Alkohol quantitativ in Zentrifugengläser überführt, klar zentrifugiert, die Lösung abgegossen, der Rückstand mit 3 ml 80% Alkohol und schließlich mit 3ml 20% Methanol erneut extrahiert mit Azeton getrocknet und in 5ml Wasser suspendiert.

Zur Bestimmung der durch Amylase spaltbaren Polysaccharide wurde 1 ml der Rückstand-Suspension abzentrifugiert, der Rückstand mit Azeton getrocknet, mit 0,1ml Amylaselösung (60 E.U./ml) und 0,1ml Tris-Puffer pH 6,8 versetzt, die Mischung 30 Minuten bei 35°C im Wasserbad inkubiert, danach zu 2ml ergänzt und abzentrifugiert. Die Lösung enthielt dann die aufgespaltenen Polysaccharide als Zucker.

Zu messen (im Methan-Durchflußzähler) waren also:
die löslichen Photosyntheseprodukte (Zucker u.a.),
die durch Amylase aufgespaltenen, unlöslichen Polysaccharide und der durch Amylase nicht veränderte unlösliche Rückstand.

Aus dem radioaktiven Anteil konnte die absolute Menge der Photosyntheseprodukte errechnet werden, da sich das Verhältnis $^{14}CO_2/CO_2$ aus der Konzentration der zugesetzten Lösung und dem Volumen des Reaktionsgefäßes ermitteln läßt.

Zur Messung der Amylaseaktivität wurden aus Blättern jeweils $1cm^2$ große Blattstücke(25 mg) herausgeschnitten, in 0,5ml Tris-Puffer pH 6,8 homogenisiert und nach Zusatz von 0,5ml radioaktiver Stärke-Suspension (Aktivität 8000 dpm/50µl) 30 Minuten bei 35°C im Wasserbad inkubiert, danach die Lösung klar zentrifugiert und die Aktivität der Lösung bestimmt, also den durch Amylase aus radioaktiver Stärke freigesetzten Zucker.

Zur Herstellung der radioaktiven Stärke-Suspension dienten die mehrfach ausgewaschenen, radioaktive Stärke enthaltenden Rückstände der Photosyntheseversuche(s.o.), mit soviel Tris-Puffer pH6,8 suspendiert, daß die Suspension eine Aktivität von etwa 8000 dpm/50µl erhielt.

ERGEBNISSE

Einfluß von Nährsalzen und Außenfaktoren auf das Versuchsmaterial

Pflanzen, Blattstücke und Regenerate wuchsen auf Nährboden nach WHITE(1954) oder HELLER(1953) ohne Unterschied gleich gut. Hingegen ließen sich die jungen, offensichtlich empfindlichen Pflanzen nicht ohne Nährsalze kultivieren, ganz im Gegensatz zu alten Blättern(BIGOT und NITSCH 1968; PREVOT 1948, 1967a, 1967b, 1968; SCHOTT und SCHRAUDOLF 1967; SCHRAUDOLF und REINERT 1959, WIRTH 1960).

Ein Zusatz von 1-2% Saccharose förderte die Keimung der Samen und das gesunde Wachstum der Pflanzen und Regenerate. Höhere Zuckerkonzentrationen wirkten dagegen hemmend, was auch WIRTH(1960) beschrieben hat.

Temperaturschwankungen von 21-26°C, sowie Lichtintensitäten zwischen 2500 und 4000 Lux (wohl in jedem Fall Lichtsättigung) blieben ohne merklichen Einfluß auf die Anzucht.
Bei 15-21°C wuchsen die Pflanzen langsamer. Sie ertrugen überhöhte Temperaturen zwischen 26°C und 34°C (bedingt durch technische Störungen) mehrfach jeweils mehrere Tage lang ohne Schaden.

Morphologische Veränderung der Regeneration durch Wuchsstoffe

Ohne Wuchsstoffe auf Grundmedium(s.o.) kultivierte Blätter bildeten innerhalb von 30 Tagen am Hauptnerv oberhalb der Schnittkante 0-4 Sprosse(Mittelwert: 2,7) und 0-5 Wurzeln (Mittelwert: 3,6) pro Blatt (Abb 1, 10-14). Die Zahl der Regeneratanlagen, die mikroskopisch klein blieben und mit der Lupe nicht erkannt werden konnten, war beträchtlich höher(s.u. Anatomischer Ablauf der Regeneration).

Zwischen dorsal und ventral kultivierten Blättern bestand kein Unterschied im Regenerationsvermögen, anders als bei Peperomia(HARRIS und HART 1964), obwohl auch bei Begonia rex Spaltöffnungen nur auf der Blattunterseite auftreten. Sproß- und Wurzelregeneration waren voneinander unabhängig im Gegensatz zu Peperomia(HARRIS und HART 1964). Manche Blätter bildeten nur Sprosse oder Wurzeln aus.

Regenerate entstanden sowohl an der Blattoberseite als auch an der Unterseite. Die nach unten, in den Nährboden hinein gerichteten Sprosse verkümmerten meist. Hingegen entwickelten sich nach oben, in die Luft gerichteten Wurzeln in der Regel normal. Sie krümmten sich zurück und wuchsen in den Nährboden (Abb.1).

Innerhalb von 6-8 Wochen erreichten die ersten Blätter der Regenerate die Größe des Mutterblattes. Sie wuchsen schneller als die aus Samen gekeimten Pflanzen.

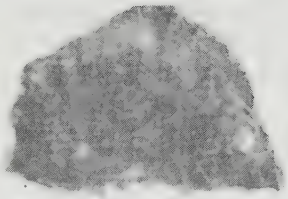
Gibberellinsäure hemmte die Bildung von Regeneraten proportional zur Konzentration im Bereich von 10^{-8}-10^{-5}g/ml (Abb.2und10) 10^{-9}g/ml zeigten alleine keine signifikanten Hemmeffekte, doch genügte diese Konzentration, um die erhebliche Sproßvermehrung durch Kinetin(s.u. und Abb.7) stark zu beeinträchtigen. Gibberellinsäure konnte die Regeneratbildung niemals bei allen Blattstücken einer Versuchsreihe vollständig unterdrücken. Selbst bei Zusatz von 10^{-5}g/ml Gibberellinsäure traten noch vereinzelt Sprosse und Wurzeln auf.

1 2 3

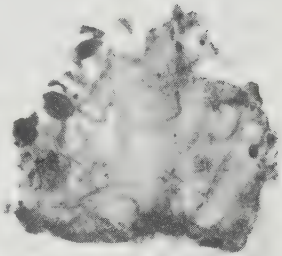
Abb.1. Blattstück von Begonia rex ohne Wuchsstoffzusatz kultiviert(Kontrolle), 30 Tage nach Versuchsansatz: Wenige Sproß- und Wurzelregenerate an der Schnittkante am Hauptnerv (Vergrößerung 1,8fach)

Abb.2. Blattstück von Begonia rex mit 10^{-6}g/ml Gibberellinsäure kultiviert, 30 Tage nach Versuchsansatz: Sproß- und Wurzelregeneration durch Gibberellinsäure unterdrückt (Vergrößerung 1,8fach)

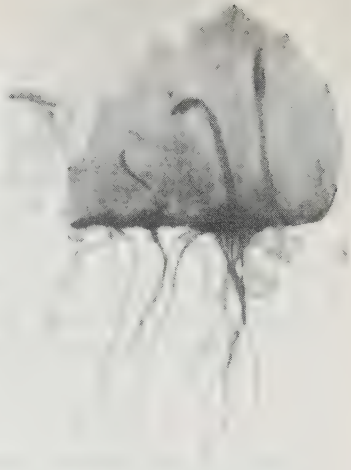
Abb.3. Blattstück von Begonia rex mit 10^{-5}g/ml Fluorenol kultiviert, 30 Tage nach Versuchsansatz: Wurzelbildung unterdrückt, stark vermehrte Sproßbildung, Sprosse teratomartig, Auftreten der Sproßregenerate auf der gesamten Blattfläche (Polaritätsaufhebung) (Vergrößerung 1,8fach)



4



5

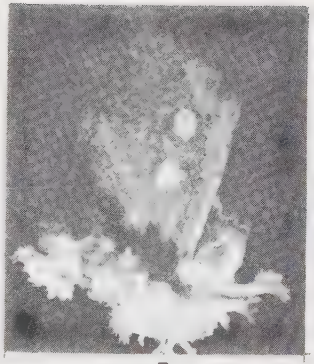


6

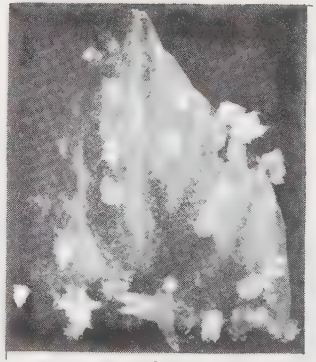
Abb.4. Blattstück von Begonia rex mit 10^{-5}g/ml IES kultiviert, 30 Tage nach Versuchsansatz: Sproßbildung gehemmt, Wurzelbildung stark vermehrt, Auftreten der Wurzelregenerate auf der gesamten Blattfläche(Polaritätsaufhebung) (Vergrößerung 1,8fach)

Abb.5. Blattstück von Begonia rex mit 10^{-6}g/ml IES kultiviert, 30 Tage nach Versuchsansatz: Sproß- u n d Wurzelbildung durch IES stark vermehrt, Auftreten der Regenerate auf der gesamten Blattfläche(Polaritätsaufhebung) (Vergrößerung 1,8fach)

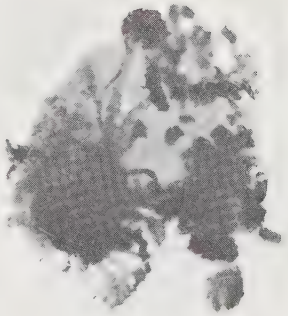
Abb.6. Blattstück von Begonia rex mit kombiniertem Zusatz von 10^{-6}g/ml IES und 10^{-6}g/ml Gibberellinsäure kultiviert, 30 Tage nach Versuchsansatz: Sprosse durch Gibberellin auffällig verlängert, durch IES vermehrtes Auftreten von Sproß- und Wurzelregeneraten auf der gesamten Blattfläche(Polaritätsaufhebung) (Vergrößerung 1,8fach)



7



8



9

Abb.7. Blattstück von Begonia rex mit 10^{-6}g/ml Kinetin kultiviert, 30 Tage nach Versuchsansatz: Wurzelbildung gehemmt, stark vermehrte Sproßbildung entlang der Schnittkante, keine Sproßbildungen auf der Blattfläche (teilweise Aufhebung der Polarität) Vergrößerung 1,8fach)

Abb.8. Blattstück von Begonia rex mit kombiniertem Zusatz von 10^{-6}g/ml Kinetin und 10^{-7}g/ml Fluorenol kultiviert, 30 Tage nach Versuchsansatz: Wurzelbildung gehemmt, vermehrte Sproßbildung auf der gesamten Blattfläche (Polaritätsaufhebung), Sprosse teratomartig (Vergrößerung 1,8fach)

Abb.9. Blattstück von Begonia rex mit kombiniertem Zusatz von 10^{-6}g/ml Kinetin und 10^{-6}g/ml IES kultiviert, 30 Tage nach Versuchsansatz: Besonders starke Vermehrung der Sproß- und Wurzelregenerate, Auftreten der Regenerate auf der gesamten Blattfläche(Polaritätsaufhebung) (Vergrößerung 1,8fach)

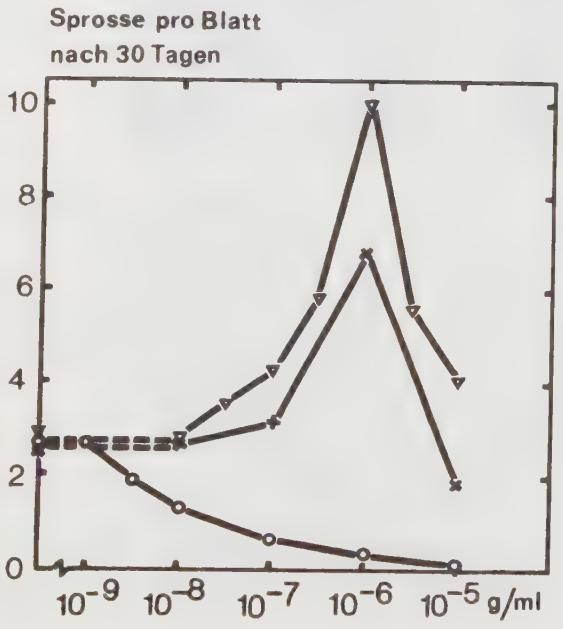
IES-Zugabe erhöhte sowohl die Zahl der Wurzelregenerate als auch die Zahl der Sproßregenerate bei unterschiedlichen Konzentrationsoptima (Abb. 11). Diese betrugen für die Sproßbildung 10^{-6}g/ml und für die Wurzelbildung 10^{-5}g/ml, wobei diese hohe IES-Konzentration die Sproßbildung beeinträchtigte (Abb. 4 und 5). Von den zahlreichen Regeneraten eines Blattes wuchsen einige zur normalen Größe heran, während die übrigen klein blieben. Regenerate traten auf der gesamten Blattfläche auf (Abb. 4 und 5), blieben also nicht nur auf die Schnittkante am Hauptnerv beschränkt (Aufhebung der Polarität).

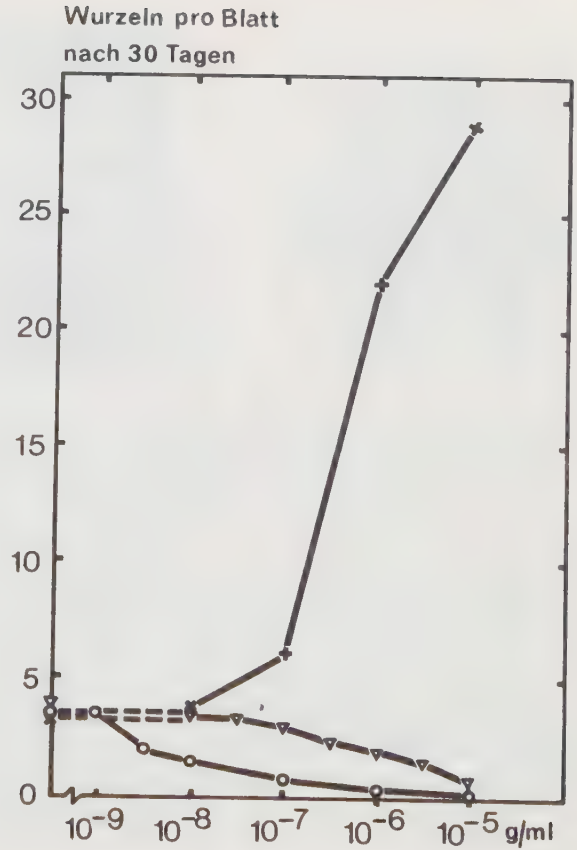
Kinetin rief starke Kallusbildung an der Schnittkante hervor und erhöhte die Zahl der Sproßregenerate proportional zur Konzentration (Optimum 10^{-6}g/ml). Die Sprosse wurden entlang der ganzen Schnittkante gebildet, nicht aber auf der gesamten Blattfläche wie bei SCHRAUDOLF und REINERT (1959). Die Sprosse blieben alle klein und wenig ausdifferenziert. Kinetin hemmte die Wurzelregeneration (Abb. 7 und 10).

Fluorenol (10^{-5}–10^{-6}g/ml) verzögerte die Regeneration, hemmte die Bildung von Wurzeln, erhöhte die Zahl der Sproßregenerate , die unter Aufhebung der Polatität auf der ganzen Blattfläche auftraten (Abb. 3 und 4). Die Sprosse blieben klein und waren tetratomartig ausgebildet (Abb. 3). Dieselben Befunde sind inzwischen auch von SCHOTT und SCHRAUDOLF (1967) festgestellt worden.
Bei 50% der Versuchsansätze wirkten diese hohen Fluorenolkonzentrationen (10^{-5}–10^{-6}g/ml) allerdings toxisch. Bei geringeren Konzentrationen ($5 \cdot 10^{-7}$–10^{-8}g/ml) zeigte sich eine Hemmung der Wurzelregeneration, eine Erhöhung der Sproßzahl, aber weder eine Aufhebung der Polarität noch eine Verzögerung der Regeneration.

Abb. 10. Sproß- und Wurzelregeneration an Blattstücken von Begonia rex. Einfluß von Kinetin, GA_3, IES. Mittelwerte aus 10 Versuchsreihen

Ordinate: Anzahl der Regenerate
Abszisse: Konzentration der Wuchsstoffe
o—o GA_3 x—x IES ▽—▽ Kinetin





Neben der Reaktion der Blätter auf einzelne Wuchsstoffe interessierte besonders die Wirkung von Wuchsstoffkombinationen. IES hob die durch Gibberellin hervorgerufene Hemmung der Regeneratbildung weitgehend auf und erzielte dabei eine signifikante Sproß- und Wurzelvermehrung über den Kontrollwert ohne Wuchsstoffzusatz hinaus. Die starke Förderung, die IES ohne Gibberellinzusatz hervorruft, konnte dabei aber nicht erreicht werden(Abb.11). Diese „Aufhebung der Gibberellinhemmung" zeigte immer das typische Bild einer „Vermehrung der Wurzelzahl durch IES". Demgegenüber war bei 50% der Blattstücke an den Sproßregeneraten die für Gibberellinsäure typische Förderung des Streckungswachstums festzustellen(Abb.6).

Mit Kinetin konnte die durch Gibberellinsäure ausgelöste Hemmung der Regeneratbildung nicht zurückgedrängt werden. Sie erschien eher verstärkt, wie das schon SCHRAUDOLF und REINERT(1959) beschrieben haben (Abb. 12).
Die geringe Gibberellinsäure-Konzentration 10^{-9}g/ml, die - alleine zugesetzt - keinen Einfluß auf die Regeneratbildung besaß, hemmte auffälligerweise die Sproßvermehrung durch Kinetin selbst bei optimaler Kinetin-Konzentration(10^{-6}g/ml) (Abb. 12).

Niedrige Konzentrationen von Fluorenol (10^{-8}–10^{-7}g/ml) hoben eine Hemmung der Sproßregeneration durch schwache Gibberellin-Konzentrationen(10^{-7}–10^{-8}g/ml) teilweise auf. Höhere Gibberellin-Konzentrationen blieben wie bei SCHOTT und SCHRAUDOLF(1967) durch Fluorenol unbeeinflußt(Abb.14).

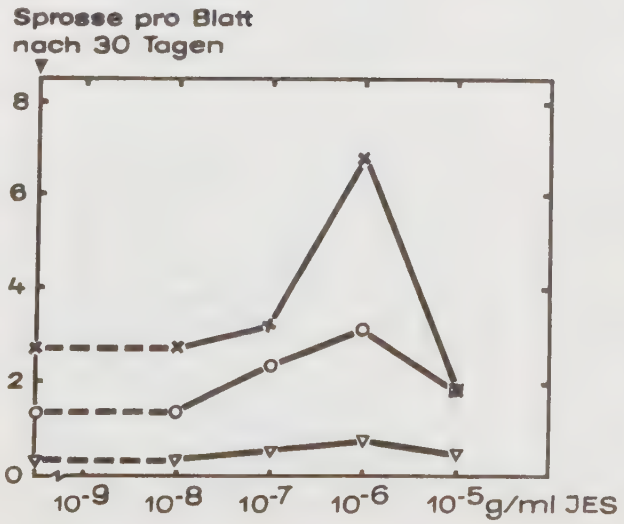
Bei kombinierter Zugabe von IES und Kinetin wurde die IES-abhängige Aufhebung der Polarität der Regeneration, also das apolare Auftreten von Regeneraten auf der ganzen Blattfläche, von Kinetin nicht gestört. Kinetin schien diesen Effekt eher zu verstärken, denn während bei niedriger IES-Konzentration(10^{-7}g/ml) Sprosse nur am Hauptnerv oberhalb der Schnittkante auftraten, erfolgte bei gleichzeitigem Kinetinzusatz eine Aufhebung der Polarität.

Abb. 11. *Sproß-Wurzelregeneration an Blattstücken von Begonia rex bei kombinierter Zugabe von IES und GA_3*
Mittelwerte aus 3 Versuchsreihen

Ordinate: Anzahl der Regenerate
Abszisse: Konzentration von IES

x—x *IES* o—o *IES* + 10^{-8} g/ml GA_3

▼—▼ *IES* + 10^{-6} g/ml GA_3



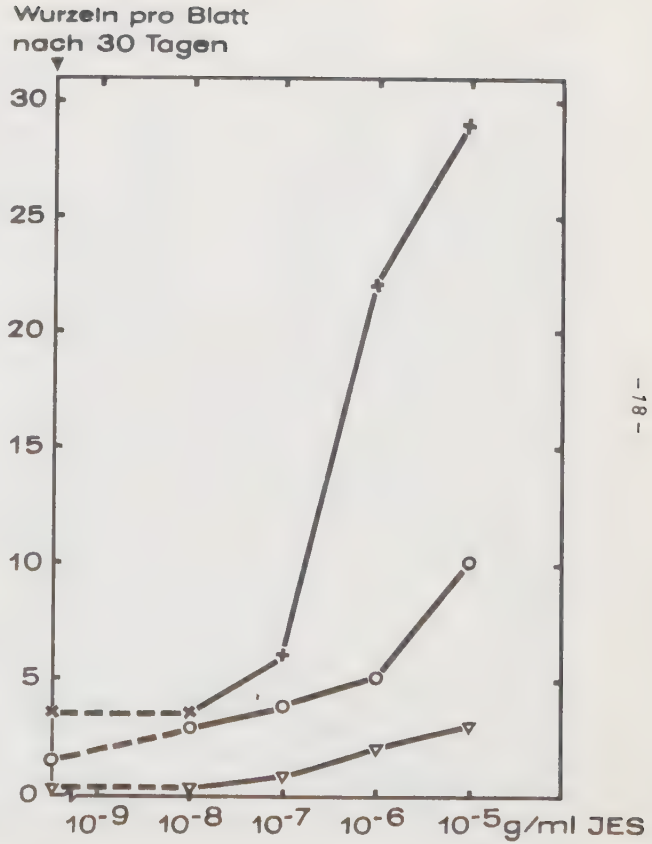


Abb. 12. *Sproß- und Wurzelregeneration an Blattstücken von Begonia rex bei kombinierter Zugabe von Kinetin und GA_3 Mittelwerte aus 3 Versuchsreihen*

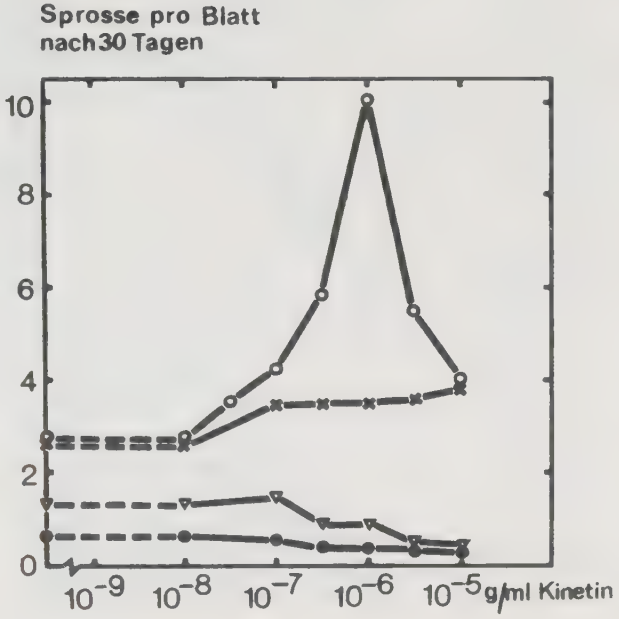
Ordinate: Anzahl der Regenerate *Abszisse: Konzentration von Kinetin*

o——o *Kinetin*

x——x *Kinetin* + 10^{-9} *g/ml* GA_3

▽——▽ *Kinetin* + 10^{-8} *g/ml* GA_3

●——● *Kinetin* + 10^{-7} *g/ml* GA_3



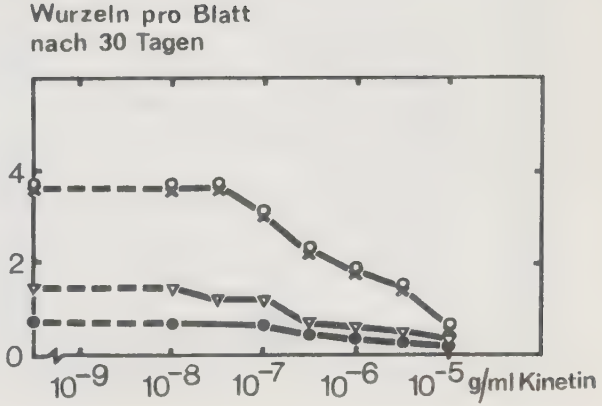
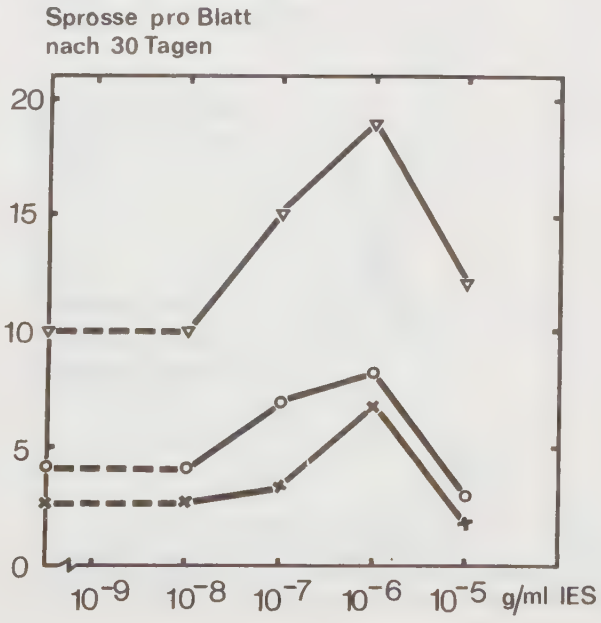
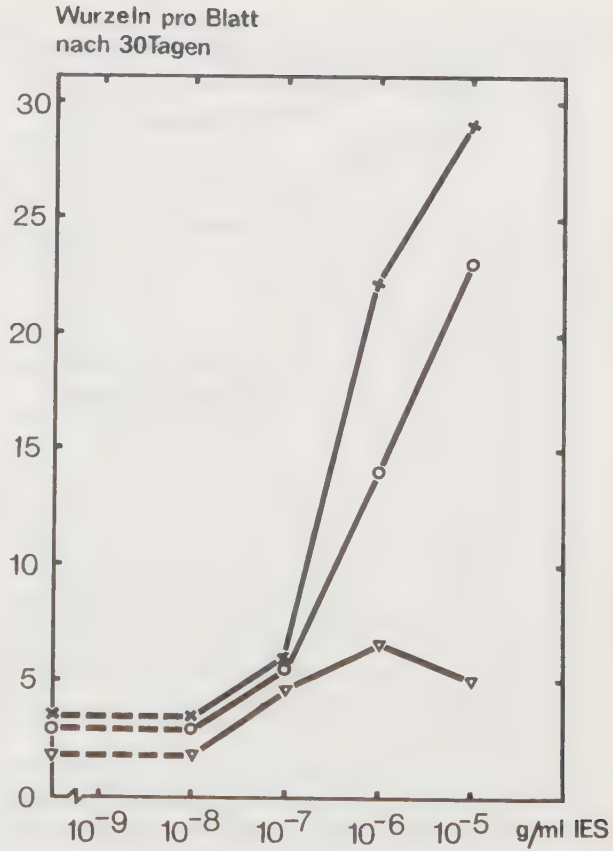


Abb.13. Sproß= und Wurzelregeneration an Blattstücken von Begonia rex bei kombinierter Zugabe von IES und Kinetin
Mittelwerte aus 3 Versuchsreihen

Ordinate: Anzahl der Regenerate
Abszisse: IES Konzentration
x—x IES o—o IES+10^{-7} g/ml Kinetin
▽—▽ IES+10^{-6} g/ml Kinetin





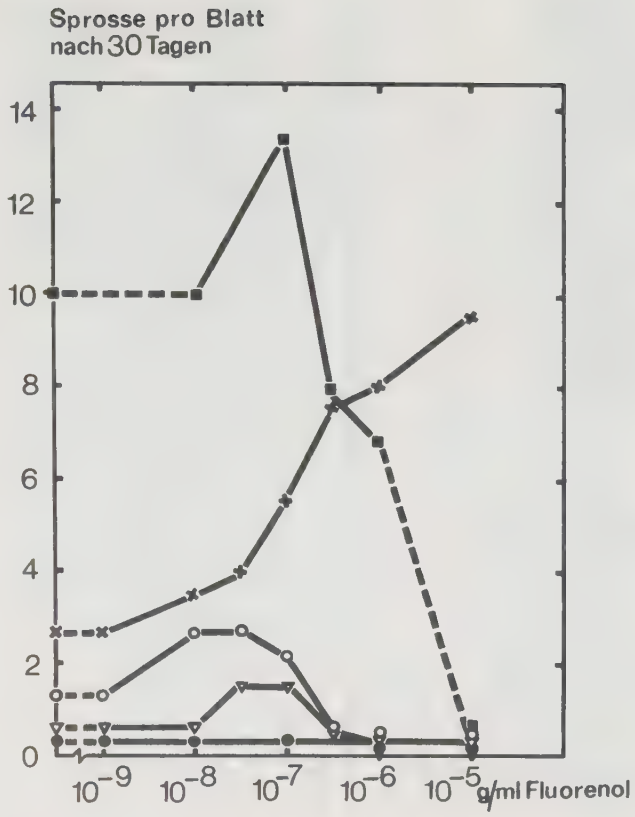
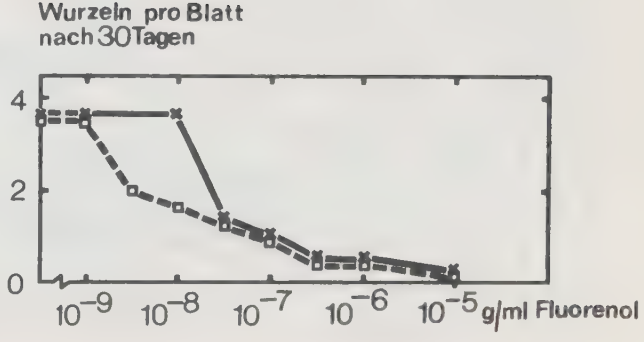


Abb. 14. Sproß- und Wurzelregeneration an Blattstücken von Begonia rex bei kombinierter Zugabe von Fluorenol und GA_3, sowie Fluorenol und Kinetin; Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen

Ordinate: Anzahl der Regenerate
Abszisse: Konzentration von Fluorenol
x—x Fluorenol; ■——■ Fluorenol + 10^{-6} g/ml Kinetin; o—o Fluorenol + 10^{-8} g/ml GA_3; ▽——▼ Fluorenol + 10^{-7} g/ml GA_3; ●——● Fluorenol + 10^{-6} g/ml GA_3; □--□ Fluorenol + 10^{-8} - 10^{-6} g/ml GA_3;



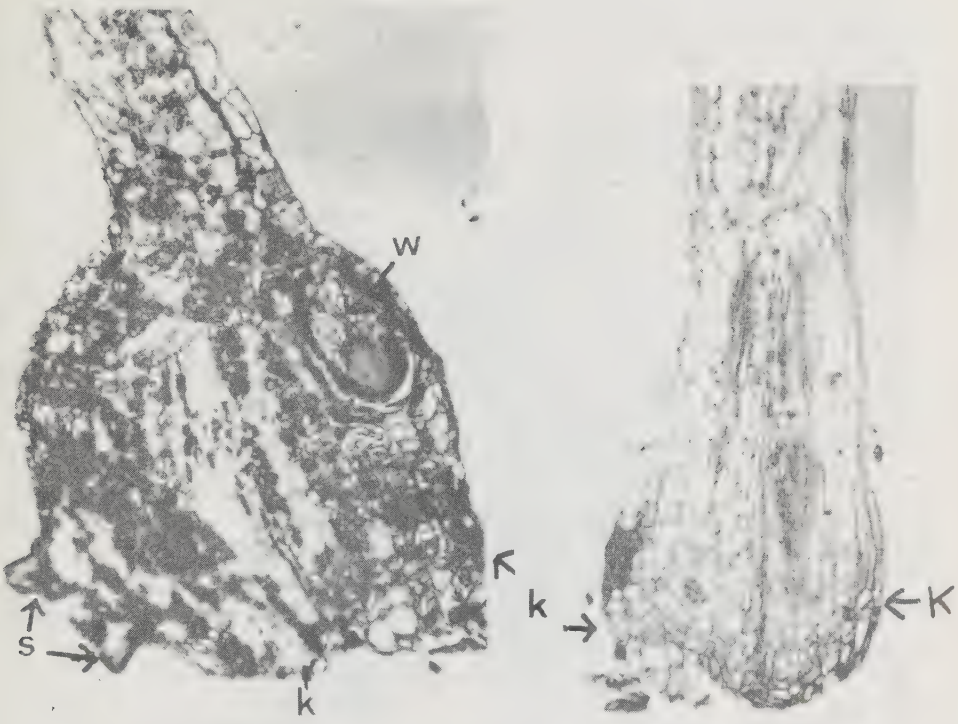
Lediglich hohe Kinetin-Konzentrationen (10^{-6}–10^{-5} g/ml) beeinträchtigten die Vermehrung der Wurzelzahl durch IES. Dabei entstanden aber immer noch mehr Wurzeln als bei den Kontrollansätzen ohne Wuchsstoffzusatz. Gleichzeitig traten mehr Sproßbildungen auf als bei der Zugabe nur eines Wuchsstoffs. So konnte die starke Erhöhung der Sproßzahl durch Kinetin selbst bei optimaler Kinetin-Konzentration (10^{-6} g/ml) durch IES noch weiter erhöht werden. Dabei bewirkte IES gleichzeitig apolare Regeneration und vermehrte Wurzelbildung (Abb. 9 und 13).

Bei Kombination schwacher Fluorenol-Konzentrationen ($5 \cdot 10^{-7}$–10^{-7} g/ml) mit Kinetin traten mehr Sprosse auf als bei Kinetin oder Fluorenol allein. Dabei entstanden Sprosse auf der ganzen Blattfläche, obwohl Kinetin oder schwache Fluorenol-Konzentrationen alleine keine Polaritätsaufhebung hervorriefen (Abb.14). Höhere Fluorenol-Konzentrationen wirkten mit Kinetin kombiniert toxisch.

Anatomische Veränderungen durch Wuchsstoffe

Es lag nahe, die hier beschriebenen morphologischen Veränderungen der Regeneration anatomisch zu untersuchen. Die Ergebnisse von Schnittserien der ohne bzw. mit Gibberellinsäure($5 \cdot 10^{-7}$ g/ml) kultivierten Blätter sind in Kurzfassung bereits vorläufig veröffentlicht worden (MÜNZEL 1968).

Die Regeneration an Kontrollblättern ohne Wuchsstoffzusatz begann nach fünf Tagen mit zahlreichen Zellteilungen in allen Zellschichten oberhalb der Schnittkante am Hauptnerv. Gleichzeitig trat hier eine in den folgenden Tagen zunehmende Anhäufung großkörniger Stärke auf (Abb. 15a und 18a). Eine solche Stärkeakkumulation ist von HARTSEMA(1926) für ältere Blattstücke bei anderen Kulturbedingungen ausdrücklich bestritten worden.



a b

Abb. 15. Schnitte durch Blattstücke von Begonia rex median am Hauptnerv, 18 Tage nach Versuchsbeginn (Vergrößerung: 55fach)

a) Ohne Gibberellinsäure kultiviert (Kontrolle)
oben: Blatt unverändert
unten: Regenerationsbereich mit Stärkeanhäufung, starker Zellteilung, endogenem Wurzelregenerat(W), exogenem Sproßregenerat(S) und Wundkallus(K)

b) Mit Gibberellinsäure($5 \cdot 10^{-7}$ g/ml) kultiviert:
Wundkallus(K), sonst wenig Zellteilungen, keine Stärkeanhäufung, keine Regeneratbildungen

Nach sieben Tagen entstanden endogen Wurzeln aus Zellen, die an das Phloem angrenzten (Abb. 15 und 16). Einige Tage später durchbrachen die jungen Wurzeln die Epidermis (Abb.16).

Vom 9. Tag an bildeten sich exogen Sprosse aus Epidermiszellen am Hauptnerv oberhalb der Schnittkante. Zwischen den neu entstandenen Sproßregeneraten und den benachbarten Leitbündeln wurde eine Verbindung (Leitbündelbrücke) angelegt (Abb.17). Haarschuppen, die hier überdies nur vereinzelt auftraten, spielten keine Rolle bei der Sproßregeneration im Gegensatz zu den Angaben von PREVOT(1948) und den Vermutungen von REGEL(1876). Nur etwa 30-50% der insgesamt angelegten Sproßregenerate wuchsen zur normalen Größe heran, die übrigen blieben mikroskopisch klein. Bevorzugt waren offenbar Regenerate in günstiger Stellung zu einem Leitbündel.

An der Schnittkante bildete sich immer Wundkallus. Teilungen im Kallus ließen sich daran erkennen, daß hierbei nur Querwände auftraten, nicht aber auch Längs- und Schrägwände wie im Bereich der Regeneratbildungen(Abb.15). Durchschnittene Leitbündel regenerierten nicht, so daß der Kallus hier unterbrochen blieb.

Bei Zusatz von Gibberellinsäure ($5 \cdot 10^{-7}$ g/ml) unterblieben die Stärkeakkumulation, die Zellteilungen oberhalb der Kallusschicht und die Ausbildung von Regeneraten (Abb.15 und 17). Gleichzeitig verschwanden die großen Stärkekörner(Abb. 15 und 17). Die Blätter enthielten nur noch kleine Stärkekörnchen, deren Ränder unscharf begrenzt, also korrodiert erschienen (Abb. 18). Die Bildung von Wundkallus blieb dabei unbeeinflußt. Verstärkte Verholzung ließ sich nicht feststellen. Auch ein Absterben der Zellen, also eine unspezifische, toxische Wirkung der Gibberellinsäure war nicht zu beobachten.

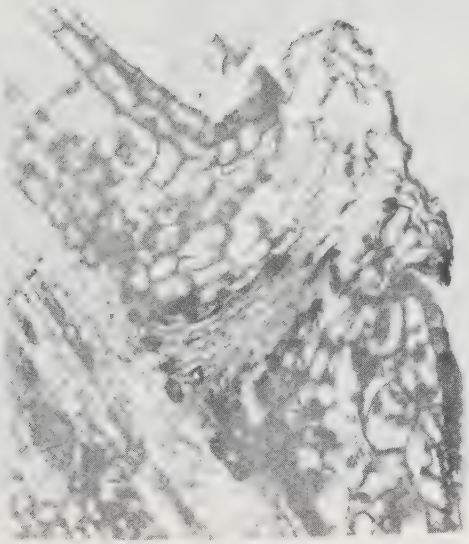
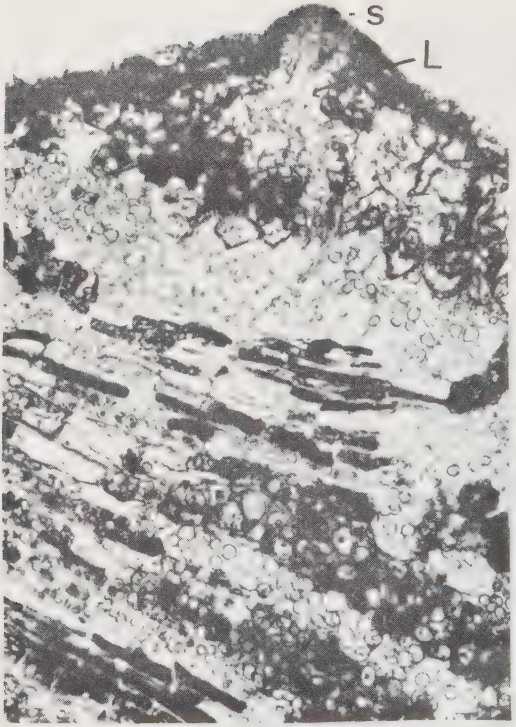
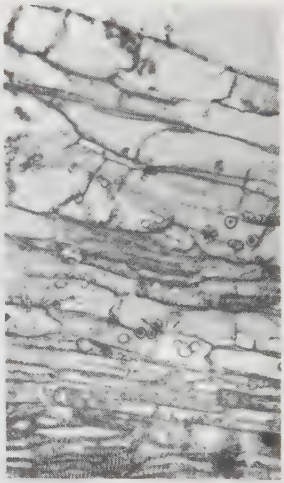


Abb. 16. Schnitt durch ein Blattstück von Begonia rex längs am Hauptnerv, 10 Tage nach Versuchsbeginn, ohne Wuchsstoffe kultiviert (Kontrolle): Herauswachsendes Wurzelregenerat, hervorgegangen aus Nachbarzellen des Phloems, durchbricht Parenchym und Epidermis (Vergrößerung: 100fach).



a

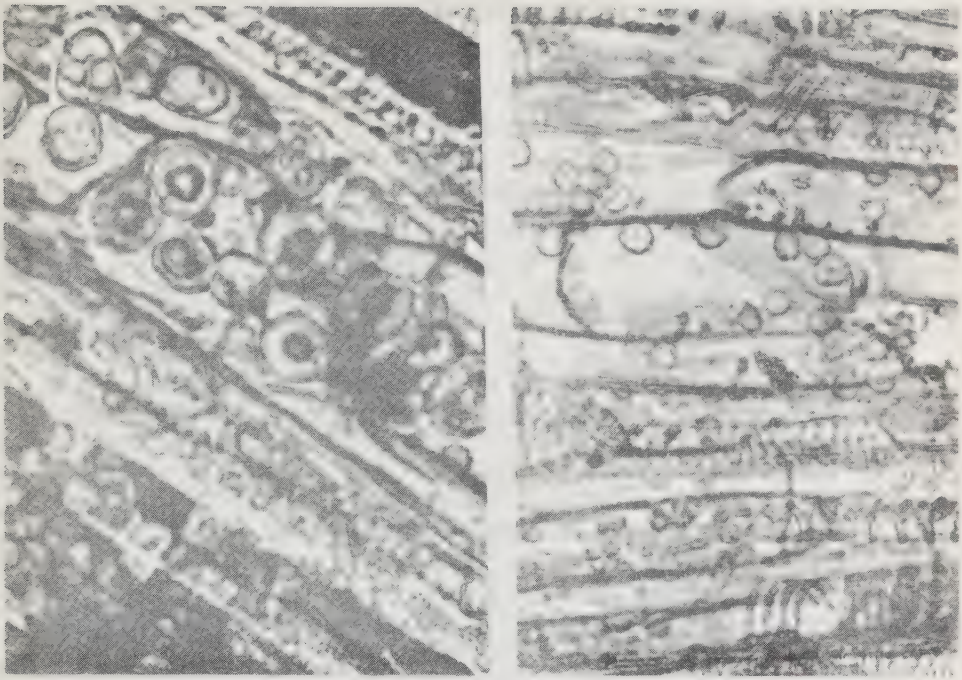


b

Abb. 17. Schnitte durch Blattstücke von Begonia rex längs am Hauptnerv, 18 Tage nach Versuchsbeginn (Vergrößerung: 130fach)

a) Ohne Gibberellinsäure kultiviert(Kontrolle): Auffällige Stärkeanhäufung, starke Zellteilung (starker Zuwachs), exogen gebildetes Sproßregenerat(S) Anlage einer Verbindung(Leitbündelbrücke - L) vom Sproßregenerat zum Leitbündel

b) Mit Gibberellinsäure($5 \cdot 10^{-7}$ g/ml) kultiviert: Hemmung der Stärkeakkumulation, der Zellteilung (kein Zuwachs) und der Regeneratbildung



a b

Abb. 18. Schnitte durch Blattstücke von Begonia rex längs im Hauptnerv, 18 Tage nach Versuchsbeginn (Vergrößerung: 500fach)

a) Ohne Gibberellin kultiviert (Kontrolle): Auffällige Stärkeanhäufung, Stärkekörner groß mit scharf begrenzten Rändern

b) Mit Gibberellinsäure($5 \cdot 10^{-7}$ g/ml) kultiviert: Wenig Stärke, Körner klein mit unscharf begrenzten Rändern (korrodiert)

Das anatomische Bild der mit IES oder Kinetin hervorgerufenen Veränderungen ist nur gelegentlich an Handschnitten untersucht, nicht aber photographiert worden.

Unter IES-Einfluß verliefen Stärkeanhäufung, Zellteilungen und Regeneratbildungen offensichtlich wie bei den Kontrollblättern ohne Wuchsstoffzusatz, lediglich entstanden Regenerate in größerer Zahl und auf der gesamten Blattfläche. Zahlreiche, überall aus der Blattfläche herauswachsende Wurzeln (Abb. 4 und 5) bewiesen, daß im Parenchym bei der Initialbildung anfangs vermehrt Teilungen stattgefunden haben müssen, doch war das restliche Parenchym in der Nähe der Leitbündel nicht stärker geteilt als bei den Kontrollansätzen. Alle Wurzeln standen in direkter Verbindung mit Leitbündeln des Blattes (wie Abb. 16).

Die Hemmung der Sproßregeneration bei hoher IES-Dosis(10^{-5}g/ml) beruhte offenbar ganz einfach darauf, daß die hier besonders zahlreich auftretenden Wurzeln beim Auswachsen die Epidermis zerdrückten. Die stark beschädigten Epidermiszellen konnten dann keine Sproßregenerate mehr bilden. Dies ließ sich schon bei den Kontrollen beobachten, blieb aber dort auf die wenigen Zellen der Wurzel-Durchbruchstellen beschränkt (Abb. 15 und 16).

Kinetin erzeugte in der Epidermis oberhalb der Schnittkante, besonders an durchschnittenen Nerven starke, kallusartige Teilungen. In diesem Epidermiskallus traten Leitstränge auf, die mit den Blattnerven in Verbindung standen, offenbar - wie sonst die Wurzeln - aus Nachbarzellen des Phloems hervorgegangen waren. Die zahlreichen Sproßregenerate, die sich hier stets aus Epidermiszellen entwickelten(Abb.10) standen alle mit solchen sekundären Leitsträngen oder mit den ursprünglichen Blatt-Leitbündeln in Beziehung. Sprosse wurden nur direkt ober- oder unterhalb eines Leitstranges angelegt, traten also nie völlig isoliert im Kallus auf. Wundkallus war kaum stärker ausgeprägt als bei unbehandelten Blättern. Allerdings ging der Wundkallus vor allem an den größeren Blattnerven meist ohne scharfe Trennung in den Epidermiskallus über und ließ sich dann natürlich nur schwer abgrenzen.

Ursachen der Regenerationshemmung durch Gibberellinsäure

Die auffällige Unterdrückung der Stärkeanhäufung und Zellteilung durch Gibberellin ließ eine Hemmung der Photosynthese oder eine Erhöhung der Amylaseaktivität vermuten.

Tatsächlich veränderte Gibberellinsäure (10^{-6}g/ml) die quantitative Zusammensetzung der Photosyntheseprodukte bereits nach drei Tagen und verminderte von fünften Tag an auch die Photosyntheserate, ohne jedoch die Photosynthese vollständig zu unterdrücken.

Die Hemmung der Photosynthese durch Gibberellinsäure(10^{-6}g/ml) war sehr unterschiedlich ausgeprägt. Je nach Blattmaterial erreichte die Assimilationsrate nur noch 20-70% der Kontrollwerte. 70% der Werte lagen im Bereich von 30-40% (Mittelwert aus 10 Versuchsreihen: 33% - Abb. 20). Die absolute Menge der Photosyntheseprodukte lag erwartungsgemäß relativ niedrig (vgl. GESSNER 1960). Der Mittelwert aus 10 Versuchsreihen betrug 0,26µgC/cm^2/30min. bei Kontrollen und 0,085µgC/cm^2/30min. bei Gibberellinzusatz. (Abb. 20). Die Hemmung schien zwischen dem dritten und neunten Tag nach Versuchsansatz nicht weiter zuzunehmen, doch ließen die Versuchsbedingungen, d.h. die Variabilität des Materials und die dadurch bedingte Streuung der Ergebnisse keine differenzierteren Aussagen zu.

Die Veränderung der Photosyntheseprodukte in ihrer quantitativen Zusammensetzung läßt sich aus Abb. 19 entnehmen. Gibberellinsäure(10^{-6}g/ml) senkte den Anteil der wasserunlöslichen, durch Amylase spaltbaren Polysaaccharide von 40-50% (Mittelwert aus 10 Versuchsreihen: 44,2%) auf 15-30% (Mittelwert 23,5%). Hingegen stieg der Anteil der wasserlöslichen Produkte (Zucker u.a.) von 45-55% (Mittelwert 50%) auf 65-80% (Mittelwert 70,7%). Der prozentuale Anteil des wasserunlöslichen, durch Amylase nicht spaltbaren Rückstandes blieb unverändert und betrug mit oder ohne Gibberellin 5-8% (Mittelwert 5,8%). Offensichtlich hemmt Gibberellinsäure die Umwandlung von Zucker in Stärke.

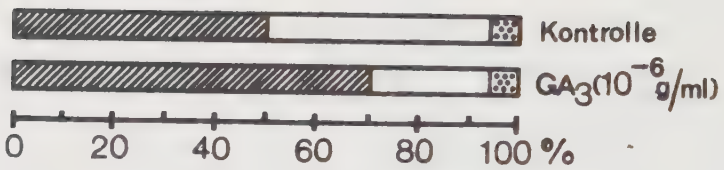


Abb. 19. Photosyntheseprodukte (in %)
der Blätter von Begonia rex
unter dem Einfluß von $GA_3(10^{-6}$ g/ml)
bestimmt aus 1 cm^2 Blattfläche(25mg)/30 min,
Mittelwerte aus 10 Versuchsreihen

oben : Kontrolle, ohne Wuchsstoffzusatz
unten: mit 10^{-6} g/ml Gibberellinsäure(GA_3)

Wasserlösliche Photosyntheseprodukte (Zucker u.a.)

Wasserunlösliche, durch Amylase spaltbare Polysaccharide (Stärke)

Wasserunlösliche, durch Amylase nicht spaltbare Polysaccharide (Zellwand u.a.)

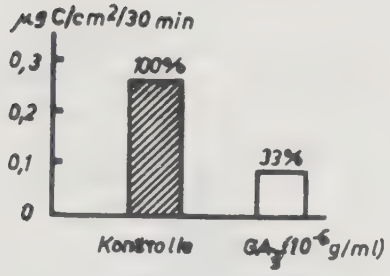


Abb. 20. Photosyntheserate der Blätter von Begonia rex unter dem Einfluß von GA_3 (10^{-6} g/ml) bestimmt aus 1 cm^2 Blattfläche (25mg)/30min, Mittelwerte aus 10 Versuchsreihen

Ordinate: Photosyntheserate (µgC/cm^2/30min)
Abszisse: ▨ Kontrolle, ☐ GA_3 (10^{-6} g/ml)

Daraufhin wurde naheliegenderweise die Amylaseaktivität überprüft. Gibberellinsäure(10^{-6}g/ml) erhöhte sie bereits nach drei Tagen. Mit Gibberellin kultivierte Blätter setzten im Vergleich zur Kontrolle die 1,6-6fache Menge Zucker aus radioaktiver Stärke frei, besaßen also eine entsprechend größere Enzymaktivität. Der rechnerische Mittelwert aus sieben Versuchsreihen ergab eine Erhöhung der Amylaseaktivität auf das 2,3fache(Abb. 21). Bei 55% der Meßwerte betrug die Aktivität das 1,6-2,5fache der Kontrolle. Hier ließen sich nur relative Werte ermitteln, da bei der Messung des aus radioaktiver Stärke freigesetzten radioaktiven Zuckers der Gehalt an Gesamtstärke (radioaktiv und inaktiv) nicht bekannt war.

Die begrenzte Zahl der Versuchsansätze ermöglichte keine Aussage darüber, ob oder wie sich die Enzymaktivität zwischen dem dritten und neunten Tag nach Versuchsansatz quantitativ ändert.

Die Unterdrückung der Stärkeakkumulation durch Gibberellin, sowohl anatomisch (Abb. 15, 17 und 18) als auch biochemisch (Abb. 19) nachgewiesen, wurde als indirekter Beweis einer Erhöhung der Amylaseaktivität angesehen.

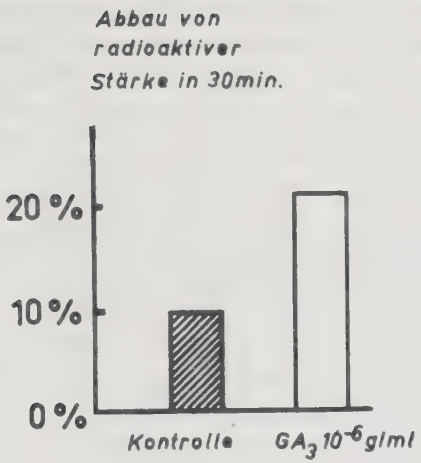


Abb.21. Amylaseaktivität
in Blattstücken von Begonia rex
unter dem Einfluß von GA_3(10^{-6}g/ml)
bestimmt aus 1cm^2 Blattfläche(25mg)
Mittelwerte aus sieben Versuchsreihen

Ordinate: Abbau (in %) aus zugesetzter, radioaktiver
Stärkesuspension(8000 dpm/ 50 µl)in 30 Minuten
Abszisse: ▨ Kontrolle, ☐ GA_3(10^{-6}g/ml)

DISKUSSION

Vor der Diskussion der Ergebnisse sollen zuerst einige methodische Probleme erörtert werden. Sterile Kulturbedingungen, optimale und konstante Außenfaktoren, einheitliches Material, sowie geeignete Methoden zur Bestimmung der Photosynthese und Amylaseaktivität waren für die Versuche notwendig.

Die Forderung nach sterilen Kulturbedingungen erscheint besonders problematisch. Die Desinfektion von Blättern mißglückte häufig (vgl. HARRIS und HART 1964). Die Ausfallrate blieb oft relativ hoch (z.B. LENSKI 1958, WIRTH 1960). Anhaftende Bakterien und insbesondere Pilzsporen sind meist widerstandsfähiger als die naturgemäß recht empfindlichen Blätter. Begonienblätter sind zur Desinfektion kaum geeignet. Sie sind sehr druckempfindlich und wegen ihrer rauhen, mit Haarschuppen besetzten Oberfläche nur schlecht benetzbar.

STICHEL(1959) und WIRTH(1960) versuchten, verschiedene Objekte unter Zusatz von Bakteriostatika zu kultivieren, doch erschien dieses Verfahren hier wegen der möglichen, unbekannten Nebenwirkungen bedenklich.

Fast alle Autoren(z.B.BIGOT 1966, PREVOT 1948, PREVOT 1968, SCHOTT und SCHRAUDOLF 1967, vgl. Einleitung) versuchen die Infektionsrate niedrig zu halten, indem sie auf Filtrierpapier kultivieren, daß nur mit Wasser nicht aber mit Nährsalzen getränkt ist. Diese Methode erweist sich - wie die Arbeiten zeigen - bei alten Blattstücken meist als brauchbar. Die damit gewonnenen Ergebnisse weichen von den Befunden, wie sie hier unter günstigereren Bedingungen erhalten wurden, nicht wesentlich ab. Allerdings berichtet PREVOT(1968) auch von Schwierigkeiten bei diesem Kulturverfahren.

Eigene Beobachtungen an Begonienblättern, die wie angegeben auf Filtrierpapier kultiviert worden waren, ergaben außerdem, daß an der Schnittkante meist nur mikroskopisch erkennbare Pilzinfektionen auftraten, die sich allerdings nicht weiter ausbreiteten.

Eine Beeinträchtigung der Blätter, wenn auch nur in geringem Umfang, läßt sich also keinesfalls ausschließen. Insbesondere Versuche über Enzymaktivitäten, wie sie hier vorliegen, könnten dann leicht angezweifelt werden. Daher erfolgte hier die sterile Anzucht junger Pflanzen aus desinfizierten Samen anstelle der problematischen Desinfektion der empfindlichen Blätter. Die Desinfektion mit Äther, wie sie für Chemikalien, nicht aber für Samen üblich ist, hat sich für Begoniensamen sehr bewährt. Das Desinfektionsmittel verdunstet von selbst und muß nicht mühsam ausgewaschen werden wie die meist benutzten wässrigen Lösungen freier Halogene (Chlorwasser, Bromwasser, Hypochloritlösungen). Auch der beträchtliche Samenverlust beim Ausspülen des Desinfektionsmittels entfällt.

Die jungen Blätter lassen sich nicht ohne Nährsalze kultivieren, anders als ältere Blätter, die offenbar keine höheren Ansprüche an die Versuchsbedingungen stellen. Die einzelnen Autoren (z.B. BIGOT und NITSCH 1968, PREVOT 1968, SCHOTT und SCHRAUDOLF 1967, WIRTH 1960, vgl. Einleitung) geben recht unterschiedliche Kulturbedingungen an, ohne daß jeweils besondere Vorteile erkennbar sind.

Nach WIRTH(1960) hat die Zusammensetzung der Grund-Nährlösung keinen Einfluß auf die Regenerationserscheinungen. Im Gegensatz dazu zeigten aber PREVOT und CHLYAH(1968), daß allein eine Veränderung der Nährsalze eine Vermehrung der Sproßregenerate bewirkt, wie sie sonst nur bei Zusatz von Kinetin auftritt. HEIDE(1962, 1964, 1965a, 1965b) hat für die verwandte Begonia x cheimantha EVERETT auch eine stärkere Abhängigkeit von Außenfaktoren nachgewiesen. Daher erscheinen möglichst konstante und optimale Nährböden und Außenfaktoren notwendig, um einen Einfluß unspezifischer, limitierender Faktoren auszuschließen. Für Begonia rex Putzey liegen hierzu keine Untersuchungen vor. Für Begonia x cheimantha hat HEIDE(1964) die Optimalbedingungen festgestellt, die nicht wesentlich von den hier gegebenen Versuchsbedingungen abweichen.

Für möglichst einheitliches Versuchsmaterial benutzten die meisten Autoren Klonkulturen, wobei die Pflanzen unter Normalbedingungen nicht steril im Gewächshaus herangezogen wurden (z.B. REINERT und BESEMER 1967, SCHOTT und SCHRAUDOLF 1967, WIRTH 1960). Solches Material läßt sich allerdings kaum zweckmäßig desinfizieren und muß deshalb zur Vermeidung stärkerer Infektionen auf feuchtem Filtrierpapier kultiviert werden. Dieses Verfahren erscheint für biochemische Versuche, wie die vorliegenden, aus den oben angegebenen Gründen nicht geeignet.

Immerhin ist es möglich, aus desinfizierten Samen Pflanzen steril heranzuziehen und dann durch Regeneratbildung an jungen Blättern Klonkulturen anzulegen. Dieses relativ mühselige Verfahren führt unter entsprechend großem zeitlichen und räumlichen Aufwand zu völlig einheitlichem Material. Damit wird ein genereller Weg zur sterilen Reinkultur von Blättern unter optimalen Bedingungen gezeigt, was bisher als problematisch galt(vgl.HARRIS und HART 1964).

Die Anlage solcher sterilen Klonkulturen war für die vorliegende Arbeit aus räumlichen Gründen nicht möglich. Hier mußte stets durch erneute Samenaussaat neues Blattmaterial herangezogen werden. Dabei erhält man eine Mischung recht unterschiedlichen Materials. Als Nachteil zeigt sich eine größere Streuung der Ergebnisse, die sich aber durch eine entsprechende Vielzahl von Versuchsreproduktionen ausgleichen und mit dem t-Test (PÄTAU 1943) statistisch absichern läßt. Im übrigen berichtet HEIDE(1965b) selbst bei Klonkulturen von stärkeren Schwankungen. Dagegen findet WIRTH(1960) bei drei Varietäten von Begonia rex keine wesentlichen Abweichungen im Regenerationsverhalten.

Im Gegensatz zu anderen Autoren(z.B. BIGOT und NITSCH 1968, PREVOT 1968, REINERT und BESEMER 1967, WIRTH 1960) dienten hier junge Blätter als Versuchsobjekt.
Dies hatte ursprünglich rein technische Gründe. Die Pflanzen lassen sich in Kulturröhrchen ohne besonderen Aufwand nicht länger als 6-8 Monate kultivieren und erreichen dabei nach drei Monaten ihre Maximalgröße.

Doch ist hier gerade durch die Benutzung junger Blätter die umstrittene Frage der Stärkeakkumulation geklärt worden. Ferner zeigen junge Blätter, daß die Sproßregeneration nicht unbedingt an spezielle Haarbildungen gebunden ist, wie dies REGEL(1876) und PREVOT(1948) annahmen.

Auch in der Versuchsdurchführung unterscheidet sich die vorliegende Arbeit von anderen Veröffentlichungen (s. Einleitung). Wuchsstoffe werden hier den Nährböden direkt zugesetzt, so daß die Blattstücke ständig unter Wuchsstoffeinfluß stehen. Andere Autoren (z.B. BIGOT und NITSCH 1968, PREVOT 1967a, PREVOT 1967b, SCHOTT und SCHRAUDOLF 1967) lassen die Versuchsblätter zuerst auf Wuchsstofflösung schwimmen und übertragen sie dann auf neutrales Nährmedium, was arbeitstechnisch umständlicher erscheint. Dabei weisen BIGOT und NITSCH(1968) bereits nach fünfminütigem Einwirken von Gibberellinsäure eine eindeutige Reaktion auf den Wuchsstoff nach. Für das Kinin 6-Benzylaminopurin genügt sogar eine Einwirkungszeit von einer Minute (HEIDE 1965b). Bei den vorliegenden Versuchen ist die Wirkung der Wuchshormone infolge der längeren Einwirkungszeit stärker ausgeprägt.

Neu ist auch das Verfahren zum Amylasenachweis, in dieser Versuchsanordnung bisher nicht beschrieben. Es beruht wie die meisten anderen Methoden auf einer Bestimmung der Glucose, die durch Amylase aus Stärke freigesetzt wird. Die üblichen Verfahren erfassen die Glucose durch Farbreaktionen mit verschiedenen Reagentien. Diese colorimetrischen Verfahren erfordern immer zwei Messungen: die Bestimmung der ursprünglich im Blatt vorhandenen Glucosemenge als Leerwert und die Bestimmung der im Versuchsansatz durch Amylase zusätzlich abgebauten Stärke. Diese Methode würde hier als Ergebnis eine kleine Differenz großer Summen liefern, was immer ungenau ist. Das hier ausgearbeitete Verfahren läßt radioaktive Stärke zusetzen und dann den durch Amylase abgespaltenen, radioaktiven Zucker bestimmen. Die Methode, die nur eine Messung erfordert, erscheint genauer, liefert allerdings nur relative Werte, denn die Menge der durch Amylase gleichzeitig abgebauten, nicht radioaktiven Stärke bleibt unbekannt.

Die Photosynthese-Bestimmung stellt eine Abänderung der von ARONOFF(1958) beschriebenen Verfahren dar, zweckmäßig vereinfacht unter Benutzung von Warburg-Trögen, wobei im Gegensatz zu ARONOFF(1958) das Umwälzen radioaktiver Luft vermieden wird.

Aus zwei Gründen interessiert der Einfluß von Wuchsstoffen und anderen Substanzen auf Regenerationsvorgänge. Einerseits soll festgestellt werden, welche Faktoren diese Vorgänge auslösen und steuern. Schon SACHS (1879) hat vermutet, daß spezielle „organbildende Substanzen" Regeneration und Wachstum beeinflussen.
Andererseits ist es notwendig, auf diesem Weg auch die biochemischen Wirkungsmechanismen dieser Stoffe zu ergründen. Dafür erscheint es wesentlich, Wechselwirkungen zwischen einzelnen Wuchshormonen aufzuklären, wobei besonders nach kompetitiven Beziehungen gesucht wurde (SCHNEIDER 1961, ZIEGLER, KÖHLER und STREITZ 1966).

Wichtig sind dabei vor allem solche Stoffe, die auch in der Pflanze selbst nativ vorkommen. DOPOSCHEG-UHLÁR (1911) beschreibt bereits die Isolierung eines Rohextrakts aus Begonien, der enzymartig wirkt. HEIDE(1967), sowie HEIDE und SKOOG(1967) weisen natürliche Gibberelline, Auxine und Kinine in Blättern von Begonia x cheimantha EVERETT nach. Auch für Begonia rex Putzey darf ein Vorkommen dieser Substanzen mit Sicherheit angenommen werden, da offensichtlich alle Kormophyten, die daraufhin untersucht worden sind Gibberelline (vgl. REINERT 1961, S.305), Auxine (vgl. GALSTON und PURVES 1960) und Kinine enthielten.

Hier ließ sich unter Wuchsstoffeinfluß feststellen: Verminderung oder Vermehrung der Sproß- und Wurzelzahl, Veränderungen an den Regeneraten (Streckungswachstum, Teratombildung), die Aufhebung der Polarität bei der Regeneratbildung, d.h. Auftreten von Sprossen auf der gesamten Blattfläche, zeitliche Verschiebung der Regeneration sowie Veränderungen am Versuchsblatt (Wachstum, Absterben). Die Diskussion erörtert zuerst die Versuche, bei denen Wuchsstoffe einzeln zugegeben wurden. Darauf folgt die Besprechung der Wuchsstoffkombinationen.

Das Regenerationsverhalten der ohne Wuchsstoffe kultivierten Blätter zeigt zu den Ergebnissen anderer Autoren (z.B. HARTSEMA 1926, SCHRAUDOLF und REINERT 1959, WIRTH 1960) nur quantitative Differenzen. Sie sind von den Außenfaktoren und dem Alter der Blätter abhängig und bei konstanten Bedingungen ohne größere Bedeutung. Infolge der günstigen Außenbedingungen bilden hier die jungen Blätter mehr Regenerate als die alten Blätter anderer Autoren(s.o.).

Nach nativen Hemmstoffen dieser Regeneration ist lange gesucht worden. Ihr Vorkommen vermutet schon PREVOT(1939), aber erst BRIAN, HEMMING und RADLEY(1955) erkennen Gibberellinsäure als Hemmstoff der Wurzelregeneration, nachdem längst zahlreiche andere Gibberellineffekte beschrieben worden waren(vgl. BRIAN, GROVE und MacMILLAN 1960). Bei Regenerationsversuchen an Blattstücken von Begonia rex induzieren SCHRAUDOLF und REINERT(1959) durch Gibberellin neben der Hemmung der Wurzelregeneration auch eine Unterdrückung der Sproßbildung. Untersuchungen an anderen Objekten bestätigen dieses Ergebnis (HARRIS und HART 1964, MURASHIGE 1961, MURASHIGE 1964).

Die Hemmung der Regeneration durch Gibberellinsäure verläuft hier im wesentlichen wie bei den vorangegangenen Arbeiten von SCHRAUDOLF und REINERT(1959), sowie REINERT und BESEMER (1967). Anders als dort entstehen hier selbst bei hoher Gibberellinsäurekonzentration(10^{-5}g/ml) noch vereinzelt Regenerate. Es war nicht möglich, die Regeneration an allen Blattstücken total zu unterdrücken, was auf die besonders günstigen Außenbedingungen zurückzuführen ist(vgl. PREVOT und CHLYAH 1968).

Es wäre naheliegend, die auch bei Kombination mit anderen Wuchsstoffen auffällige Hemmung durch Gibberellinsäure als unspezifisch-toxischen Effekt zu deuten, wie dies z.B. HENDERSON(1958) auf Grund seiner Untersuchungen an Helianthus-Gewebe annimmt. Diese Vermutung kann hier nicht zutreffen, da die Wundkallusbildung unbeeinflußt bleibt und die Versuchsblätter keineswegs absterben. Auch wird das Streckungswachstum gefördert(SCHOTT und SCHRAUDOLF 1967).

Diese Förderung ist aber ein typischer Gibberellineffekt, der seltener für isolierte Blattstücke(HUMPHRIES und WHEELER 1960, SCHOTT und SCHRAUDOLF 1967, SCOTT und LIVERMANN 1957), häufiger aber für andere Objekte nachgewiesen worden ist (vgl. BRIAN, GROVE und MacMILLAN 1960, S.398 und 403; HUMPHRIES und WHEELER 1963).

Demgegenüber bewirken andere Wuchsstoffe eine Förderung der Regeneratbildung. IES erhöht die Zahl der Wurzelregenerate an Begonienblättern, was schon BALANSARD und PELLISIER(1942) beschreiben. Dies ist ein für viele Objekte allgemein bekannter Auxin-Effekt(s.GALSTON und PURVES 1960). Die Vermehrung der Wurzelregenerate ist bei den Versuchen von WIRTH(1960) von einer Hemmung der Sproßregeneration begleitet. Dagegen stellt HEIDE(1965b) bei der verwandten Begonia x cheimantha EVERETT keinen Einfluß von IES auf die Sproßbildung fest. Hier ergibt sich wiederum ein neuer Befund. IES erhöht hier bei jungen Blättern neben der Zahl der Wurzeln auch die Zahl der Sproßregenerate, wobei Regenerate auf der gesamten Blattfläche auftreten(Aufhebung der Polarität).

Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich bei den vorliegenden Versuchen durch die besonders günstigen Kulturbedingungen erklären, da auch Nährsalze (PREVOT und CHLYAH 1968) und Außenfaktoren (HEIDE 1962, 1964, 1965a,1965b) die Regeneratbildung fördern. Nach HEIDE(1965b) ist auch das Alter des Versuchsmaterials entscheidend, da junge Blätter mehr, nicht näher definierte, „sproßbildende Substanzen" enthalten sollen. Die Vermehrung der Sproßregenerate ist offenbar von mehreren Stoffen, insbesondere von Kininen(s.u.) abhängig.

Den Einfluß von Kinetin auf die Regeneration der Blattstücke von Begonia rex Putzey untersuchten als erste SCHRAUDOLF und REINERT(1959), später auch PREVOT und ARNASON(1966). HEIDE(1965b) beschreibt gleichartige Versuche an Begonia x cheimantha EVERETT. Die hier beschriebenen Kinetin-Effekte lassen sich in ähnlicher Form auch an anderen Objekten beobachten. So regenerieren isolierte Wurzeln von Convolvulus(TORREY 1958) und Isatis (DANCKWARDT-LILIESTRÖM 1957) bei Kinetin-Zusatz vermehrt Sprosse, während die Wurzelbildung gleichzeitig gehemmt wird.

Vermehrte Kallusbildung durch Kinetin beschreiben HUMPHRIES (1960) für isolierte Hypocotylstücke von Phaseolus vulgaris, TOPONI(1963) für isolierte Blattstücke von Cichorium intybus und BESEMER(1965) für isolierte Gewebestücke aus der Rübe von Cichorium intybus.

Chemisch ähnliche Purine können gleichartige Reaktionen wie Kinetin hervorrufen. Dabei bestehen gegenüber Kinetin nur quantitative Differenzen (HEIDE 1965b, BIGOT 1966, CHLYAH-ARNASON und TRAN THAN VAN 1968, PREVOT 1967b). Hingegen blockiert 2,6-Aminopurin die Sproßregeneration vollständig (BIGOT und NITSCH 1968).

Hier regenerieren junge Blätter Sprosse nicht nur am Hauptnerv, sondern entlang der ganzen Schnittkante. Im Gegensatz zu alten Blättern (PREVOT und ARNASON 1966, SCHRAUDOLF und REINERT 1959) treten aber keine Sprosse auf der Blattfläche auf. Die Polarität wird also bei jungen Blättern nur teilweise aufgehoben. Das gleiche Verhalten stellt HEIDE(1965b) bei Begonia x cheimantha EVERETT fest.

Als Ursache dieses abweichenden Verhaltens junger Blätter kann man Differenzen in der natürlichen Wuchsstoff-Zusammensetzung annehmen, wie dies auch HEIDE(1965b) vermutet. Die Aufhebung der Polarität wird nicht allein durch Kinetin ausgelöst, sondern auch durch Auxin beeinflußt, was die vorliegenden Versuche nachweisen. Ein Einfluß von Außenfaktoren läßt sich in diesem Falle ausschließen, da die relativ günstigen Kulturbedingungen eine Aufhebung der Polarität eher fördern müßten (PREVOT und CHLYAH 1968).

Schließlich ist auch das Morphaktin Fluorenol untersucht worden, da andere Autoren(SCHNEIDER 1961, ZIEGLER, KÖHLER und STREITZ 1966) kompetitive Wechselwirkungen zwischen Fluorenol und Gibberellinsäure vermutet hatten. Bei Fluorenol-Zusatz bilden sich auffällige Sproßteratome, die darauf hinweisen, daß die Regeneration hier nicht normal abläuft. Hierauf soll bei der Erörterung der Wechselwirkung zwischen Fluorenol und anderen Wuchsstoffen noch näher eingegangen werden.

Inzwischen haben SCHOTT und SCHRAUDOLF(1967) an alten Blättern von Begonia rex den Einfluß verschiedener Morphaktine untersucht. Ihre Ergebnisse stimmen weitgehend mit den hier vorgelegten Befunden überein. Da hier im Gegensatz zu SCHOTT und SCHRAUDOLF(1967) die Wuchsstoffe dem Nährboden ständig zugesetzt wurden, verschiebt sich lediglich der Bereich der wirksamen und toxischen Konzentrationen. Toxicität setzt hier bereits bei 10^{-6}g/ml Fluorenol ein, während andererseits noch schwächere Konzentrationen (10^{-7}–10^{-8}g/ml) als bei SCHOTT und SCHRAUDOLF(1967) vermehrte Sproßregeneration hervorrufen.

Ist der Einfluß einzelner Hormone bekannt, so erscheint es zur Aufklärung biochemischer Reaktionsmechanismen wichtig, Wechselwirkungen zwischen Wuchsstoffen zu untersuchen. Daher sollte hier der Einfluß von Wuchsstoff-Kombinationen überprüft werden.

Die durch Gibberellinsäure ausgelöste Hemmung der Regeneratbildung kann mit IES weitgehend aufgehoben werden. Hier scheint eine Wechselwirkung vorzuliegen, doch zeigt die Regeneration eindeutig den Einfluß beider Substanzen nebeneinander, was eine kompetitive Beziehung ausschließt. Es lassen sich typische IES-Effekte erkennen: Sproß- und Wurzelregenerate entstehen unter Aufhebung der Polarität der Regeneration auf der Schnittkante und der Blattfläche. Es werden mehr Regenerate gebildet als bei der Kontrolle ohne Wuchsstoffzusatz, infolge Gibberellin-Zusatz aber weniger als bei Blättern, die mit IES allein kultiviert wurden. Gibberellinsäure setzt also lediglich die Zahl der Regenerate herab.

Ist der Einfluß beider Substanzen auf die Zahl der Regenerate antagonistisch, so wirkt er sich auf das Wachstum der Sprosse synergistisch aus. Gibberellinsäure ruft auch bei Begonienblättern eine typische Sproßverlängerung hervor. Diese für Gibberellin allgemein bekannte Erscheinung tritt hier natürlich nur auf, wenn die Gibberellin-bedingte Hemmung der Regeneratbildung durch IES zurückgedrängt wird.

Wirksamkeit von Gibberellin setzt also die Anwesenheit von Auxin voraus, wie dies schon BRIAN und HEMMING(1958) und KUSE(1958) für andere Versuchssysteme beschreiben. Auch additive Wechselwirkungen zwischen Gibberellin und IES werden angegeben(z.B. KATO 1958, GALSTON und WARBURG 1959, vgl. BRIAN, GROVE und MacMILLAN 1960, S.399 und 411).

Zum biochemischen Mechanismus dieser Wechselwirkungen existieren mehrere Theorien. BRIAN und HEMMING(1958) nehmen an, daß Gibberellin einen endogenen Hemmstoff des Auxin-induzierten Wachstums beeinträchtigt. GALSTON(1959) formuliert spezieller, daß Giberellin die Konzentration eines phenolischen Inhibitors des Auxinoxidase-Systems erhöht, wodurch mehr Auxin wirksam sein kann(vgl. HALEVY 1963, KATSUMI und SANO 1968). Beides trifft hier nicht zu, da Gibberellin und IES teilweise antagonistisch wirken.

PURVES und HILLMANN(1959) folgern aus ihren Versuchen, daß Gibberellin und IES voneinander unabhängig wirken. Auch PALMER(1966) findet keine Wechselbeziehung zwischen Gibberellin, Auxin und Kinetin. Für diese Theorie spricht sicherlich, daß je nach Objekt und Versuchsanordnung bald antagonistische, bald synergistische oder additive, niemals aber kompetitive Wechselwirkungen auftraten (vgl. BRIAN, GROVE und MacMILLAN 1960, S.399 und 411).

Später vermuten HILLMANN und PURVES(1961) - ähnlich auch KUSE(1958) - daß Gibberellin durch einen Auxin-abhängigen Mechanismus wirken könnte. Etwas allgemeiner formulieren schließlich KEFFORD und GOLDACRE(1961), daß die einzelnen Wuchsstoffe verschiedene, aufeinander folgende Vorgänge beeinflussen und damit indirekt voneinander abhängig sind. WRIGHT(1961) vermutet eine gleichzeitige Wirkung der einzelnen Wuchsstoffe über verschiedene Reaktionsketten, da er für verschiedene Entwicklungsstadien jeweils andere optimale Relationen von Kinetin, IES und Gibberellin feststellte.

Hier ist die Sproßverlängerung durch Gibberellinsäure abhängig von IES, entsprechend den Vorstellungen von HILLMANN und PURVES(1961). Dabei beeinflussen die Wuchsstoffe verschiedene, aufeinander folgende Schritte der Regeneratbildung. Damit kann die Theorie von KEFFORD und GOLDACRE(1961) für das vorliegende Versuchssystem übernommen werden.

Kinetin hat – anders als Auxin – keinen Einfluß auf die Regenerationshemmung durch Gibberellin. Gibberellinsäure hemmt relativ unspezifisch über einen weiten Konzentrationsbereich jede, auch die optimale Kinezinkonzentration(10^{-6}g/ml). Eine kompetitive Beziehung ist daher ausgeschlossen. Die Hemmung der Kinetin-Effekte durch die geringe Gibberellin-Konzentration 10^{-9}g/ml zeigt, daß Gibberellinsäure offenbar an grundlegender Stelle in den Regenerationsablauf eingreift. Diese Vermutung wird durch die Untersuchung der Photosynthese und der Amylaseaktivität unter Gibberellin-Einfluß bestätigt.

Zwischen Fluorenol und Gibberellinsäure hatten SCHNEIDER(1961), sowie ZIEGLER, KÖHLER und STREITZ(1966) eine kompetitive Wechselbeziehung für wahrscheinlich gehalten. Doch haben MANN, HIED, YUNG und JOHNSON(1966), TOGNONI, de HERTOGH und WITWER(1967), sowie SCHOTT und SCHRAUDOLF(1967) diese Ansicht bestritten und widerlegt. Eine Wechselwirkung auf Grund der formalen, strukturchemischen Ähnlichkeit liegt nicht vor. Die Morphaktine beeinflussen keineswegs alle Gibberellineffekte. Das durch Gibberellin geförderte Streckungswachstum der Blätter bleibt unbeeinflußt(SCHOTT und SCHRAUDOLF 1967). Andererseits zeigen die Morphaktine Effekte, auf die Gibberellinsäure keinen Einfluß hat (SCHNEIDER 1962, LORENZEN 1969).

Auch die vorliegenden Ergebnisse lassen sich nur als nichtkompetitive Beziehung deuten. Die antagonistische Wechselwirkung, die ohnehin nur im Bereich schwacher Konzentrationen auftritt, ergibt sich nur zahlenmäßig, wobei die anormale Regeneration(Teratombildung) unberücksichtigt bleibt.

Kinetin und IES beeinflussen die Wurzelbildung antagonistisch. Kinetin hemmt sie, während IES die Zahl der Wurzelregenerate erhöht. Bei gleichzeitiger Zugabe beider Hormone hebt IES die Hemmung der Wurzelregeneration durch Kinetin weitgehend auf, während umgekehrt Kinetin die Auxin-abhängige Vermehrung der Wurzelregenerate nur wenig beeinträchtigt. IES besitzt hier also einen stärkeren Einfluß als Kinetin.

Kinetin und IES beeinflussen synergistisch die Aufhebung der Polarität der Regeneration und die von beiden Substanzen geförderte Vermehrung der Sproßregenerate. Bei kombinierter Zugabe treten im Optimalbereich mehr Sprosse auf, als IES oder Kinetin - einzeln zugegeben - induzieren können. Schwache Konzentrationen beider Substanzen, die allein zugesetzt keine Wirkung hervorrufen, zeigen bei Kombination Vermehrung der Sproßzahl und Bildung von Regeneraten auf der ganzen Blattfläche. Art und Umfang der Reaktion auf Auxin oder Kinetin ist also abhängig vom Mengenverhältnis beider Substanzen, wie dies andere Autoren für völlig andere Versuchssysteme beschreiben (SACHS und THIMANN 1964, SKOOG und MILLER 1957, TOPONI 1963).

Da die Förderung der Sproßregeneration durch Kinetin auch im Optimalbereich(10^{-6}g/ml) mit Auxin noch weiter verstärkt werden kann, ist der natürliche Auxinspiegel im Blatt offenbar ein limitierender Faktor für die Kinetin-Wirkung. Daher läßt sich in Anlehnung an die Theorie von WRIGHT(1961) vermuten, daß beide Wuchsstoffe gleichzeitig für die Regenerationsvorgänge benötigt werden.

Ohne IES-Zusatz bleiben die unter Kinetin-Einfluß vermehrt gebildeten Sprosse klein, Ihr Wachstum ist offenbar Auxin-abhängig. Beide Wuchsstoffe beeinflussen hier also auch aufeinander folgende Vorgänge der Regeneration. Dies entspricht der Theorie von KEFFORD und GOLDACRE(1961), hier von dem System Gibberellin - Auxin auf die Wechselbeziehung Auxin - Kinetin übertragen.

Zur Vervollständigung der Ergebnisse ist auch die Kombination Kinetin-Fluorenol untersucht worden. Hierbei ergibt sich ein synergistischer Einfluß auf die Sproßregeneration, eine Vermehrung der Sproßregenerate und eine Aufhebung der Polarität bei der Regeneration, also ein ähnlicher Effekt wie bei der gemeinsamen Zugabe von IES und Kinetin. Fluorenol wirkt jedoch weder wie ein Auxin, da es die Wurzelbildung hemmt, noch wie ein Kinin, da die Sprosse als Teratome ausgebildet werden, die Regeneration offenbar also nicht normal abläuft. Es muß daher hier wie bei anderen Autoren offen bleiben, worauf die Wirkung der Morphaktine beruht (vgl. LORENZEN 1969).

Andere Autoren haben eine große Anzahl weiterer Substanzen untersucht: Hemmstoffe, wuchsstoffähnliche Verbindungen, Farbstoffe (insbesondere WIRTH 1960, HEIDE 1965b, BIGOT 1966, PREVOT 1967a, PREVOT und CHLYAH 1968, SCHOTT und SCHRAUDOLF 1967).

Läßt man das nativ nicht vorkommende Fluorenol außer Betracht und überschaut man die Wirkungen und Wechselbeziehungen der drei Wuchsstoffe Gibberellin, IES und Kinetin, die in chemisch ähnlicher Form auch in Begonien nachgewiesen wurden (HEIDE 1967, HEIDE und SKOOG 1967), so ergibt sich hier folgendes Bild: Durch Gibberellinsäure wird der Auxin-Effekt beeinträchtigt, der Kinetin-Effekt völlig aufgehoben. IES wiederum drängt den antagonistischen Kinetin-Einfluß auf die Wurzelbildung zurück. Damit ist eine wechselseitige Abhängigkeit der drei Substanzen gegeben. Die relative Wirksamkeit der drei Verbindungen kann durch folgende Beziehung ausgedrückt werden:

$$GA_3 < IES < Kinetin.$$

In diesem System ist die Gibberellinkonzentration bestimmend dafür, ob und in welchem Umfang Zellteilungen und Regeneratbildungen auftreten. Wieviel und welche Regenerate (Sprosse, Wurzeln) dann tatsächlich gebildet werden und auswachsen, hängt sekundär von den Konzentrationsverhältnissen zwischen IES und Kinetin ab.

IES bestimmt die Zahl der Wurzelregenerate und beeinflußt die Polarität der Regeneratbildung sowie das Wachstum der Regenerate. Das Sproßwachstum wird daneben auch durch Gibberellin gefördert. Kinetin verstärkt den Effekt der Polaritätsaufhebung, ohne ihn allein auslösen zu können. Kinetin ruft die vermehrte Bildung von Sproßregeneraten hervor, deren Wachstum aber Auxin-abhängig ist. Auch IES erhöht die Zahl der Sproßregenerate, doch ist die Förderung durch Kinetin stets stärker ausgeprägt. Kompetitive Wechselwirkungen zwischen einzelnen Wuchsstoffen konnten nicht nachgewiesen werden. Die Substanzen beeinflussen verschiedene, aufeinander folgende Schritte der Regeneration. Der gesamte Vorgang ist offensichtlich ein sehr vielschichtiger Komplex (vgl. PREVOT 1965).

Alle diese morphologischen Erscheinungen sind letztlich nur Sekundäreffekte, denen anatomische Veränderungen im Blatt vorausgegangen sein müssen. Es ist daher notwendig, das anatomische Bild der Regeneration näher zu untersuchen. Über den normalen Ablauf der Regeneration - unbeeinflußt von Wuchsstoffen - liegen ältere Arbeiten vor. Die ersten Untersuchungen hat wohl CRÜGER 1860 an Begonia hydrocotylifolia GRAH. durchgeführt. Später folgen die Arbeiten an Begonia rex PUTZ. (REGEL 1876, van THIEGEM und BOULIOT 1888, HARTSEMA 1926, PREVOT 1948). Der Verlauf der Regeneration bei Wuchsstoffzusatz ist bisher anatomisch nicht untersucht worden.

REGEL(1876) klärt bereits die wesentlichen Schritte der Regeneratbildung an Blättern,die ohne Wuchsstoffe kultiviert wurden. Er weist die endogene Entstehung der Wurzeln nach („endogen aus dem Fibrovasalsystem"). HANSEN(1881), sowie van THIEGEM und DOULIOT(1888) führen die Untersuchungen von REGEL(1876) weiter und geben etwas genauer an, daß die Wurzeln sich aus Zellen entwickeln, die an die Leitbündel angrenzen (Perizykelzellen). PREVOT(1948) zeigt schließlich, daß nur die an das Phloem angrenzenden Zellen Wurzelregenerate ausbilden, nicht aber die Perizykelzellen des Xylems.

Dies wird hier bestätigt. Die Leitbündel der größeren Blattnerven sind ringförmig angeordnet (vgl. HARTSEMA 1926), wobei das Phloem nach außen, das Xylem nach innen weist. Wurzeln entstehen nur an der Außenseite (Phloemseite) der Leitbündel, was auch anatomisch einleuchtend ist. Häufig sind hier bei jungen Blättern die Perizykelzellen aber so groß, daß sie gleichzeitig an Phloem und Xylem angrenzen, was möglicherweise die abweichende Ansicht von HANSEN(1881), sowie von van THIEGEM und DOULIOT(1888) erklärt.

REGEL(1876) stellt auch bereits die exogene Sproßbildung aus Epidermiszellen fest, während SACHS(1874) noch eine endogene Entstehung annimmt. Die ältere Literatur, die sich mit zahlreichen, heute weniger wichtigen Einzelfragen beschäftigt, besprechen ausführlich HARTSEMA(1926), PREVOT(1948) und LENSKI(1958). Hier sollen nur die Befunde der vorliegenden Arbeit erörtert werden, die zu den Angaben anderer Autoren im Widerspruch stehen: die Anzahl der Regenerate pro Blatt, die Faktoren der Auslösung der Regeneration und das Problem der Polarität bei der Regeneratbildung.

Die meisten Autoren berichten von der Entstehung nur eines Sprosses und nur einer Wurzel am durchschnittenen Hauptnerv (HARTSEMA 1926, SCHRAUDOLF und REINERT 1959, WIRTH 1960). Hier zeigt die anatomische Untersuchung, daß die Zahl der tatsächlich angelegten Regenerate beträchtlich höher ist, wie dies auch indirekt aus der Arbeit von PREVOT(1968) hervorgeht. PREVOT erhält nach dem Abschneiden der Regenerate weitere Neubildungen, dabei wachsen dann offenbar die bereits angelegten, in ihrer Weiterbildung aber gehemmten Regenerate aus. Die Versuchsreihen zahlreicher Autoren(z.B. SCHRAUDOLF und REINERT 1959, WIRTH 1960, BIGOT 1966, PREVOT 1967a und b) ergeben also nur die relativen Zahlenwerte der makroskopisch oder mit Lupe sichtbaren Regenerate, lassen aber die Zahl der insgesamt angelegten Sprosse oder Wurzeln außer Betracht.

Regenerationserscheinungen treten nur in der Nähe eines Leitbündels auf. Zwar können sich hier nach Verletzung des Gewebes oder nach Isolierung von Gewebestücken alle Zellschichten teilen, doch regenerieren Epidermiszellen nur Sprosse, niemals Wurzeln. Parenchymzellen am Phloem dagegen bilden Wurzeln, niemals Sprosse. Die übrigen Zellschichten teilen sich nur. An der Schnittkante entsteht aus allen Zellschichten Wundkallus. Je nach Lage im Zellverband treten also genau festgelegte Restitutionserscheinungen auf, wobei außerdem ein Organ, ein Leitbündel, Voraussetzung dafür ist, daß überhaupt Regenerate gebildet werden können. Auch die Verbindung, die zwischen Leitbündel und Sproßregenerat hergestellt wird, beweist die Bedeutung des Leitbündels für die Sproßbildung. Diese Leitbündelbrücke kann leicht übersehen werden, vor allem wenn nicht parallel zum Hauptnerv sondern quer zum Hauptnerv geschnittenen wurde, wie z.B. bei HARTSEMA(1926), die diese Leitbündelverbindung nicht erwähnt.

Substanzen aus dem Leitbündel beeinflussen also ganz offensichtlich Sproßregeneration und Sproßwachstum. Schon HARTSEMA(1926) hat angenommen, daß ein „Teilungsreiz" vom Leitbündel ausgeht, da sie feststellen konnte, daß die Zellteilungen im Phloemparenchym beginnend nach außen fortschreiten.

PREVOT(1948) lehnt dagegen einen „endogenen Reiz" als auslösenden Faktor für die Sproßregeneration ausdrücklich ab. Er weist darauf hin, daß ja gerade die Epidermiszellen am wenigsten mit Substanzen aus dem Leitbündel versorgt werden können, ein Wuchsstoffeinfluß also viel eher für Vorgänge im Parenchym (Zellteilungen, Wurzelbildungen) verantwortlich sein müßte. Zwar erscheint bei den von PREVOT benutzten alten Blättern die Leitbündelverbindung relativ spät, aber auch dort finden Teilungen und Regeneratbildungen nur im Bereich der Blattadern statt, was PREVOT allerdings nicht angibt, aus seinen Abbildungen aber eindeutig hervorgeht.

PREVOT(1948) entwickelt auf Grund seiner anatomischen Befunde eine andere Theorie, der sich neuerdings auch BIGOT und NITSCH(1968) angeschlossen haben. PREVOT hatte festgestellt, daß nur solche Epidermiszellen Sprosse bilden, die an Haarschuppen(poils epidermiques, poils glanduleux) liegen. Er nimmt daher an, daß diese Haarschuppen, wie dies übrigens schon REGEL(1876) vermutet hat, bei der Sproßregeneration von Bedeutung sein müßten und möglicherweise eine Ernährungsfunktion besäßen.

Für die hier verwendeten jungen Blätter trifft diese Vermutung mit Sicherheit nicht zu. Haarschuppen finden sich hier nur vereinzelt. Es besteht kein Zusammenhang mit der Sproßregeneration. Selbst PREVOT(1968) bezeichnet in einer neueren Arbeit die ganze Epidermis als totipotent. HARTSEMA(1926) und WIRTH(1960) sind auf diese Haarbildungen nicht eingegangen.

Nach Induktion der Regenerate müssen zum Wachstum der Sprosse und Wurzeln genügend Nährstoffe vorhanden sein. Hierbei ist Stärke offenbar als Energiequelle für die Prozesse der Organogenese notwendig, um den hohen Energiebedarf bei der Regeneratbildung zu decken. Dies vermuten schon GOEBEL(1908)und DOPOSCHEG-UHLÁR(1911) und betrachten die Anhäufung von „Reservestoffen" als wesentliche Voraussetzung für die Regeneration an Begonien. Neuerdings ist an verschiedenen anderen Objekten nachgewiesen worden, daß der Organogenese eine Stärkeanhäufung vorausgehen muß (SADIK und OZBUN 1967, THORPE und MURASHIGE 1968). Dies gilt auch für Begonia rex, wie die auffällige Anhäufung von Stärke beweist.

Diese Stärkeakkumulation ist für Begonia rex bisher nicht beschrieben worden. HARTSEMA(1926, S.540) kann sie bei alten Blättern nicht feststellen und lehnt die Vermutungen von GOEBEL(1908) und DOPOSCHEG-UHLÁR ausdrücklich ab.

Doch muß dabei berücksichtigt werden, daß junge Blätter nur mäßig viel Stärke enthalten, eine Stärkeanhäufung daher leicht nachzuweisen ist, während alte Blätter mit Stärke vollgestopft sind, eine Stärkeanhäufung ganz sicher viel weniger auffällt und leicht übersehen werden kann. HARTSEMA(1926) hat die Stärkeanhäufung auch nur durch makroskopische Betrachtung von Blattstücken nach Jodanfärbung, nicht aber anatomisch nachzuweisen versucht. Möglicherweise unterbleibt bei alten Blattstücken aber auch eine sichtbare Stärkeakkumulation, weil die Blätter bereits genügend Stärke angehäuft haben, was aber nicht ausschließt, daß die Blätter zur Regeneration ein bestimmtes Stärkepotential benötigen.

Die Gibberellinsäure-Behandlung läßt die Bedeutung der Stärkeanhäufung für die Regeneration klar erkennen. Die Hemmung der Regeneratbildung durch Gibberellinsäure beruht anatomisch auf einer Verhinderung der Stärkeakkumulation und Auflösung der vorhandenen Stärke, sowie auf einer Hemmung der Zellteilung. Damit ergibt sich für den auffälligen Gibberellineffekt eine relativ einfache anatomische Erklärung.

Die gleiche Hemmwirkung der Gibberellinsäure auf Stärkeanhäufung und Zellteilung haben inzwischen auch THORPE und MURASHIGE(1968) am Nicotiana-Kallus beobachtet. Obwohl es sich dabei um ein ganz anderes Objekt handelt, besteht völlige Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Ergebnissen. Hier handelt es sich also offensichtlich nicht um einen isolierten, nur für Begonia rex gültigen Gibberellineffekt, sondern um eine, auch an anderen Objekten reproduzierbare Erscheinung, was eine Untersuchung der biochemischen Ursachen nahelegte.

Durch Gibberellin induzierte Verholzung, wie sie ERGLE(1958) MURASHIGE(1964), THORPE und MURASHIGE(1968), sowie CHENG und MARSH(1968) diskutieren, treten bei Begonia rex nicht auf, was bei normalerweise nicht verholzendem Blattgewebe auch verständlich ist. Verholzungserscheinungen an anderen Objekten sind offenbar lediglich Sekundäreffekte, wie hier die Unterdrückung der Regeneration.

Hier sei noch kurz auf das Problem der Polarität bei der Regeneratbildung eingegangen, das vor allem in der älteren Literatur viel diskutiert wird (DOPOSCHEG-UHLÁR 1911, HARTSEMA 1926, WIRTH 1960, PREVOT 1967a), da Blattstücke von Begonia rex auffälligerweise nur am basalen Ende Regenerate bilden.

Das anatomische Bild beweist, daß die Regeneration an Blättern ohne Wuchsstoffzusatz in starker Abhängigkeit von einem Leitbündel steht. Die bevorzugte Bildung von Regeneraten an der unteren Schnittkante kann – in Übereinstimmung mit älteren Theorien(vgl.HARTSEMA1926) – auch hier darauf beruhen, daß sich die Wuchsstoffe an der basalen Schnittkante anhäufen.

Wird die Polarität der Regeneratbildung durch IES oder Kinetin aufgehoben, so zeigen die Schnitte, daß auch dann alle Regenerate mit Leitbündeln in Verbindung stehen. Bei Zusatz von IES oder Kinetin werden durch die Wuchsstoffe Zellteilungen induziert. Die Aufhebung der Polarität durch IES ist also kein primärer Auxin-Effekt, sondern eine sekundäre Folge verstärkter Teilungsaktivität. In ähnlicher Weise erklärt sich auch der Kinetineffekt. Das vermehrte Auftreten von Sproßregeneraten läßt sich auf die lebhaften Teilungen in der Epidermis zurückführen. Wurzelbildung wird nicht gefördert, da der Epidermiskallus nach außen wächst, die Parenchymschichten also unbeeinflußt bleiben. PREVOT und CHLYAH(1968) haben neuerdings gezeigt, daß die Aufhebung der Polarität auch durch Nährsalze hervorgerufen werden kann.

Das interessanteste Ergebnis der bisher erörterten Versuche ist die Hemmung der Regeneratbildung durch Gibberellinsäure, die auf einer Hemmung der Zellteilung und Stärkeakkumulation beruht. Zur Deutung dieses Befundes wurden zwei Hypothesen aufgestellt und überprüft. Einerseits konnte angenommen werden, daß eine Photosynthesestörung vorliegt und daher Stärkebildung unterbleibt. Andererseits ließ sich vermuten, daß Gibberellin eine Erhöhung der Amylaseaktivität induziert, wodurch vermehrt Stärke abgebaut und der Aufbau neuer Stärke verhindert wird. Beides konnte nachgewiesen werden.

Einen direkten Einfluß der Gibberellinsäure auf die Photosynthese haben schon vor Jahren HABER und TOLBERT(1957) untersucht. Doch können sie bei mehreren Objekten keine Veränderung der Photosyntheserate oder der Photosyntheseprodukte feststellen.

Auch die bei vielen Objekten durch Gibberellinsäure hervorgerufene Chlorose läßt einen Einfluß auf die Photosynthese infolge Chlorophyllzerstörung vermuten. Doch scheint verstärktes Streckungswachstum lediglich einen Chlorophyllverlust vorzutäuschen, zumal die Chlorose meist nach einiger Zeit wieder verschwindet (WOLF und HABER 1960, BISHOP und WHITTINGHAM 1961, WHEELER und HUMPHRIES 1963). Die Autoren haben aber Menge und Zusammensetzung der Assimilationsprodukte nicht untersucht.

Im Gegensatz zu diesen Arbeiten ist hier der Einfluß auf die Photosynthese sehr auffällig. Gibberellinsäure setzt nicht nur die Menge der Photosyntheseprodukte herab, sondern verändert auch ihre quantitative Zusammensetzung. Der Stärkeanteil sinkt, während der Anteil an wasserlöslichen Photosyntheseprodukten steigt. Diese Verschiebung ist schon vor der Herabsetzung der Photosyntheserate nachweisbar, beruht also offenbar nicht primär auf der Hemmung der Assimilation. Dann dürfte auch die Photosyntheserate nur vermindert, nicht aber verändert sein.

Als Ursache für die zuerst anatomisch und hier jetzt auch biochemisch nachgewiesene Unterdrückung der Stärkeanhäufung durch Gibberellinsäure schien eine Erhöhung der Amylaseaktivität wahrscheinlich. Der direkte Nachweis der erhöhten Amylaseaktivität bestätigte diese Vorstellung.

Amylaseaktivierung durch Gibberellinsäure war bisher nur vom Gerstenkorn bekannt (HAYASHI 1940, MUNEKATO und KATO 1957, PALEG 1961, BRIGGS 1963, VARNER 1964, VARNER und RAM CHANDRA 1964, FILNER und VARNER 1967). Offensichtlich aktiviert dort Gibberellinsäure den gesamten Hydrolasenkomplex (JACOBSEN und VARNER 1967, SEITZ und LANG 1968).

Die vorliegenden Versuche beweisen Amylaseaktivierung durch Gibberellinsäure für ein völlig anderes Objekt. Dieser biochemische Prozeß ist demnach nicht an die spezifischen Bedingungen eines bestimmten Versuchssystem gebunden.

Für das vorliegende System, junge isolierte Blätter von Begonia rex PUTZEY läßt sich folgende Reaktionskette angeben: Gibberellinsäure erhöht die Amylaseaktivität, wodurch vermehrt Stärke abgebaut, der Aufbau neuer Stärke verhindert wird. Dies führt zu einem Ansteigen des Glucosespiegels und dadurch sekundär zu einer Störung der Photosynthese. Damit wird eine wesentliche Voraussetzung für Zellteilung und Regeneratbildung blockiert: die Schaffung einer Energiequelle durch Stärkeakkumulation. Als Folge davon unterbleiben Zellteilungen und Regeneratbildungen. Da Gibberellin hier an relativ grundlegender Stelle eingreift, ist die Wirkung anderer Wuchshormone weitgehend abhängig von der Gibberellinkonzentration. Kompetitive Wechselbeziehungen zwischen einzelnen Wuchsstoffen bestehen nicht. Die einzelnen Substanzen beeinflussen verschiedene, aufeinander folgende Schritte der Regeneration. THORPE und MURASHIGE(1968) postulieren auf Grund ihrer Untersuchungen an Nicotiana-Kallus dort das gleiche System, ohne aber bisher eine Erhöhung der Amylaseaktivität nachgewiesen zu haben. Wahrscheinlich ist die Aktivierung von Amylase oder anderen Hydrolasen ein grundlegender Mechanismus zahlreicher Gibberellineffekte.

Die Versuchsanordnung ermöglicht keine Entscheidung darüber, ob die Erhöhung der Amylaseaktivität auf verstärkter Amylasesynthese beruht, oder ob Interaktionen des Gibberellins mit Amylasehemmstoffen vorliegen.

Schon früher ist versucht worden, Gibberellineffekte durch Inaktivierung oder Zerstörung von Hemmstoffen zu erklären, wie dies für die Wechselwirkung mit IES in einigen Versuchssystemen wohl zutrifft (HALEVY 1963, KATSUMI und SANO 1968, vgl. BRIAN, GROVE und MacMILLAN 1960, S.400). Ob auch die Erhöhung der Hydrolasenaktivität auf Hemmstoffzerstörung beruht, ist nicht geklärt. Hier müßte es sich bei der relativ umfassenden Wirksamkeit der Gibberellinsäure auf zahlreiche Hydrolasen um recht unspezifische Hemmstoffe handeln(Phenole o.ä.).

Über die Existenz solcher Substanzen ist bei Begonia rex nichts bekannt. Widersprüchliche Befunde an anderen Objekten diskutieren THORPE und MURASHIGE(1968).

Demgegenüber neigen heute mehrere Autoren zu der Ansicht, daß Gibberellinsäure die de-novo-Synthese von Hydrolasen, insbesondere von Amylase induziert(VARNER 1964, VARNER und RAM CHANDRA 1964, SEITZ und LANG 1968). Den absoluten Beweis der de-novo-Synthese von Amylase im Gersten-Endosperm aus Reserveproteinen haben FILNER und VARNER(1967) mit einer Dichtemarkierungsmethode erbracht.

Vermutet man Gibberellin-gesteuerte Enzymsynthese, so bleiben die Schritte dieser Synthese zu klären. Daher wird neuerdings in verstärktem Maße der Einfluß von Gibberellinsäure auf die Enzymbausteine (Proteine, RNS) untersucht(z.B.YUNG und MANN 1967, KAUFMANN, GHOSHEH und IKUMA 1968, GAYLER und GLASZIOU 1969). Es läßt sich aus diesen Arbeiten ableiten, daß die Gibberellinsäure – wahrscheinlich in den Prozeß der Transskription eingreifend – eine Synthese spezieller m-RNS reguliert. Damit wäre auch die Amylase- bzw. Hydrolasensynthese kein primärer Gibberellineffekt. Die Arbeiten an Begonia rex PUTZEY müßten in dieser Richtung weitergeführt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Junge Pflanzen von Begonia rex Putzey können aus Samen, die mit Äther desinfiziert wurden, steril herangezogen werden.

Isolierte Blätter regenerieren innerhalb von 30 Tagen 0-4 Sprosse(Mittelwert: 2,7) und 0-5 Wurzeln(Mittelwert:3,6) oberhalb der Schnittkante am Hauptnerv.

Gibberellinsäure(10^{-8}-10^{-5}g/ml) unterdrückt Sproß- und Wurzelregeneration, Kinetin(10^{-8}-10^{-5}g/ml) und Fluorenol (10^{-8}-10^{-5}g/ml) hemmen die Wurzelbildung, während IES (Optimum 10^{-5}g/ml) sie fördert, wobei Wurzeln auf der gesamten Blattfläche apolar gebildet werden. Kinetin(Optimum 10^{-6}g/ml), Fluorenol(Optimum 10^{-5}g/ml) und IES(Optimum 10^{-6}g/ml) erhöhen die Zahl der Sproßregenerate. Diese entstehen bei Kinetin entlang der Schnittkante, bei IES und Fluorenol auf der ganzen Blattfläche (Aufhebung der Polarität bei der Regeneration). Fluorenol bewirkt teratomartige Sproßbildung.

IES - nicht aber Kinetin - hebt die Hemmung der Regeneration durch Gibberellinsäure weitgehend auf. Dabei zeigen die Sproßregenerate durch Gibberellin stark gefördertes Streckungswachstum. Fluorenol kann diese Gibberellin-Hemmung nur im Bereich schwacher Gibberellin-Konzentrationen (10^{-8}-10^{-7}g/ml) zurückdrängen. IES hebt die Hemmung der Wurzelbildung durch Kinetin weitgehend auf. Bei gemeinsamer Zugabe beider Substanzen werden mehr Sprosse gebildet als durch IES oder Kinetin allein. Auch Fluorenol verstärkt den Kinetineffekt der Sproßvermehrung.

Die anatomischen Untersuchungen der Regeneration ergaben: Der Regeneratinduktion gehen eine - bisher nicht beschriebene - auffällige Stärkeanhäufung und Zellteilungen voraus. Blätter ohne Wuchsstoffzusatz bilden in bekannter Weise endogen Wurzeln aus Nachbarzellen des Phloems und exogen Sprosse aus Epidermiszellen. An der Schnittkante entsteht Wundkallus. Auch bei Zusatz von IES oder Kinetin stehen alle Regenerate mit Leitbündeln in direkter Verbindung, Sprosse durch eine während der Regeneratbildung angelegten Leitbündelbrücke. Kinetin erzeugt in der Epidermis oberhalb der Schnittkante starke, kallusartige Teilungen.

Gibberellinsäure beeinflußt die Bildung von Wundkallus nicht, unterdrückt aber die Stärkeakkumulation und die Zellteilungen oberhalb der Kallusschicht, damit sekundär auch die Regeneration. Als Ursache dieser Effekte wurde eine Hemmung der Photosynthese und eine Erhöhung der Amylaseaktivität nachgewiesen. Die Messung der Amylaseaktivität erfolgte durch Bestimmung des aus radioaktiver Stärke freigesetzten Zuckers.

Für die Regeneration wird folgende Reaktionskette formuliert: Gibberellinsäure erhöht die Amylaseaktivität, wodurch vermehrt Stärke abgebaut, der Aufbau neuer Stärke verhindert wird. Dies führt zu einer Veränderung des Glucosespiegels und dadurch zu einer Störung der Photosynthese. Infolgedessen unterbleiben Zellteilungen und Regeneratbildung. Da Gibberellin hier an relativ grundlegender Stelle in die Regeneration eingreift, ist die Wirkung anderer Wuchshormone weitgehend abhängig von der Gibberellin-Konzentration. Kompetitive Wechselwirkungen zwischen einzelnen Wuchsstoffen konnten nicht nachgewiesen werden. Die einzelnen Substanzen beeinflussen verschiedene, aufeinanderfolgende Schritte der Regeneration.

LITERATUR

ARONOFF, S.: Techniques of Radiobiochemistry, Ames, Iowa, 65 (1958)

BALANSARD, J. und F. PELLISSIER: Action de l'hétérouauxine sur la bouturage foliaire des quelques Bégoniacées, C.R.Soc.Biol., Paris, 136, 305 (1942)

BESEMER, J.: Über das Wachstum und die Morphogenese der in vitro kultivierten Gewebe von Cichorium intybus L., Dissertation Math.-Nat. Fakultät, Freie Univ. Berlin (1965)

BIGOT,C.: Action de trois adénines substituées sur l'apparition de néoformations sur les explantats foliaires de Bégonia, Bull.Soc.Bot.France 113, 433-439 (1966)

BIGOT, C. und J.P. NITSCH: Effet du moment de l'application d'acide gibberellique ou de 2,6-diaminopurine sur la néoformation des bourgeons chez Begonia rex Putzey, C.R.Acad.Sc.Paris 267, 619-621(1968)

BISHOP, P. und C.P. WITTINGHAM: Gibberellic acid and chlorophyll content of leaves of Meteor pea, Nature 192, 576-577 (1961)

BRIAN, P.W., J.F. GROVE und J. MacMILLAN: The Gibberellins, Fortschr. der Chemie organ. Naturstoffe XVIII, Wien, 350-433 (1960)

BRIAN, P.W. und H.G. HEMMING: Complemantary action of gibberellic acid and auxins in pea internode extension, Ann.Bot. 22, 1-17 (1958)

BRIAN, P.W., H.G.HEMMING und M.RADLEY: A physiological comparison of gibberellic acid with some auxins, Physiol.Plant 8, 889-912(1955)

BRIGGS, D.E.:Biochemistry of barley germination. Action of gibberellic acid on barley endosperm, J.Indst.Brewing 69, 13-19 (1963)

CHENG, C.K.C. und H.V. MARSH jr.: Gibberellic acid - promoted lignification and phenylalanine ammonia - lyase activity in dwarf pea (Pisum sativum L.), Plant Phys. 43, 1755-1759 (1968)

CHLYAH-ARNASON, A. und M. TRAN THAN VAN: Budding capacity of undetached Begonia rex leaves, Nature 218, 493 (1968)

CRÜGER, H. : Einiges über die Gewebeveränderungen bei der Fortpflanzung durch Stecklinge, Botan. Zeitung 18, 369-374 (1860)

DANCKWARDT-LILIESTRÖM, C.: Kinetin-induced-shoot formation from isolated roots of Isatis tinctoria, Physiol. Plant 10, 794 (1957)

DOPOSCHEG-UHLÁR, J.: Studien zur Regeneration und Polarität der Pflanzen, Flora 102, 24-80 (1911)

ERGLE, D.R. : Compositional factors associated with the growth response of young cotton plants to gibberellic acid, Plant Phys. 33, 344-346 (1958)

FILNER, P. und J.E. VARNER: A test for de-novo-synthesis of enzymes: density labeling with H_2O^{18} of barley α-amylase induced by gibberellic acid, Proc.Nat.Acad.Sci.US. 58, 1520-1526 (1967)

GALSTON, A.W.:Studies on indoleacetic acid oxidase inhibitor and its relation to photomorphogenesis. In: Photoperiodism and related phenomena in plants and animals, ed. R.B.Withrow, American Ass. for the Advancement of Science, Washington D.C. (1959)

GALSTON, A.W. und W.K. PURVES: The mechanism of acton of auxin, Ann. Rev. of Plant Physiol 11, 239-267 (1960)

GALSTON, A.W. und H. WARBURG: An analysis of auxin-gibberellin interaction in pea stem tissue, Plant Physiol 34, 26-22 (1959)

GAYLER, K.R. und K.T. GLASZIOU: Plant enzyme synthesis: Hormonal regulation of invertase and peroxidase synthesis in sugar cane, Planta 84, 185-194(1969)

GESSNER, F.: Die Assimilationsbedingungen im tropischen Regenwald; Handbuch der Pflanzenphysiologie V,2, Berlin, Göttingen und Heidelberg 492-505 (1960)

GOEBEL, K. : Einleitung in die experimentelle Morphologie der Pflanzen Leipzig und Berlin, 15 und 192 (1908)

HABER, A.H. und N.E. TOLBERT: Photosynthesis in gibberellin-treated leaves, Plant Phys. 32, 152-153 (1957)

HALEVY, A.H.: Interaction of growth retarding compounds and gibberellin on indoleacetic acid oxidase and peroxidase of cucumber seedlings, Plant Phys. 38, 731-732 (1963)

HANSEN, A. : Vergleichende Untersuchungen über Adventivbildungen bei Pflanzen, Abhdl. Senckenberg. Naturforsch. Ges. 12, (1881)

HARRIS, G.P. und E.M.H. HART: Regeneration from leaf squares of Peperomia sandersii A.DC.: A relationship between rooting and budding, Ann. Bot. N.S. 28, 509-526 (1964)

HARTSEMA, A. M.: Anatomische und experimentelle Untersuchungen über das Auftreten von Neubildungen an Blättern von Begonia rex, Rec. d. trav. bot. néerland. 23, 305-361 (1926)

HAYASHI, T. : Action of Gibberellin on the production of amylase during germination, J. Agric.Chem.Soc. Japan 16, 531 (1940)

HEIDE, O.M. : Interaction of night temperature and day length in flowering of Begonia x cheimantha Everett, Physiol. Plant. 15, 729-735 (1962)

- - : Effects of light and temperature on the regeneration ability of Begonia leaf cuttings, Physiol. Plant. 17, 789-804 (1964)

- - : Photoperiodic effects on the regeneration ability of Begonia leaf cuttings, Physiol. Plant. 18, 185-190 (1965a)

HEIDE, O.M. : Interaction of temperature, auxins, and kinins in the regeneration ability of Begonia leaf cuttings Physiol. Plant. 18, 891-920 (1965b)

- - : The auxin level of Begonia leaves in relation to their regeneration ability, Physiol. Plant. 20, 886-902 (1967)

- - und F. SKOOG: Cytokinin activity in Begonia and Bryophyllum Physiol. Plant. 20, 771-780 (1967)

HELLER, R. : Recherches sur la nutrition minerale des tissus végétaux cultivés in vitro, Ann. d. Sc. nat. ser. XI, 14, 1-223 (15-17) (1953)

HENDERSON, I.M.H.: Effect of gibberellin on sunflower tissue culture, Nature 182, 880 (1958)

- - Influence of hydrogen ion concentration and autoclaving on gibberellin, Nature 185, 628 (1960)

HILLMANN, W.S. und W.K. PURVES: Does gibberellin act through an auxin mediated mechanism? Proc. 4th Int. Conf. on Plant Growth Regulation, Iowa State Press, Ames (1961)

HUMPHRIES, E.C.: Inhibition of root development on petiols and hypocotyls of dwarf bean (Phaseolus vulgaris) by kinetin, Physiol. Plant. 13, 659-663 (1960)

- - und A.W. WHEELER: The effects of kinetin, gibberellic acid, and light on expansion and cell division in leaf disk of dwarf bean, J. exper. Bot. 11, 81-85 (1960)

- - - - : The physiology of leaf growth, Ann. Rev.of Plant Phys. 14, 385-411 (1963)

JACOBSEN, J.V. und J.E. VARNER: Gibberellic acid - induced synthesis of protease by isolated aleuron layers of barley, Plant Physiol. 42, 1595-1600 (1967)

JENSEN, W.A.: Botanical Histochemistry San Francisco und London 65f. (1962)

KATO, J. : Studies on the physiological effect of gibberellin II. On the interaction of gibberellin with auxin and growth inhibitors, Physiol. Plant. 11, 10-15 (1958)

KATSUMI, M. und H. SANO: Relationship of IAA-oxidase activity to gibberellin and IAA-induced elongation of light grown cucumber seedlings, Physiol. Plant. 21, 1348-1355 (1968)

KAUFMANN, P.B., N. GHOSHEH und H. IKUMA: Promotion of growth and Invertase activity by gibberellic acid in developing Avena internodes, Plant Phys. 43, 29-34 (1968)

MEFFORD, N.P. und P.L. GOLDACRE: The changing concept of auxin, American Journal of Botany 48, 643-650 (1961)

KUSE,G. : Necessity of auxin for the growth effect of gibberellin, Bot. Mag. Tokyo 71, 151-159 (1958)

LENSKI, I. : Über die Brutzwiebelbildung auf den Blättern von Drimopsis kirkii, Planta 50, 579-621 (1958)

LORENZEN, H.: Morphaktine, Naturwiss. Rundschau 22,23 (1969)

MANN,J.D., H. HIELD, K.H. YUNG und D. JOHNSON: Independence of morphactin and gibberellin effects upon higher plants, Plant Phys. 41, 1751-1752 (1966)

MÜNZEL, E. : Hemmung der Regeneration an Begonia rex - Blattstücken durch Gibberellin, Naturwiss. 55, 659 (1968)

MUNEKATA, H. und S. KATO: Biochemical studies of the bakanae fungus 40. Application of gibberellin to the malting industry, Bull. Brewing Sci. Tokyo 3, 1 (1957)

MURASHIGE, T.: Suppression of shoot formation in cultured tobacco cells by gibberellic acid, Science 134, 280 (1961)

- - : Analysis of the inhibition of organ formation in tobacco tissue culture by gibberellin, Physiol. Plant. 17, 636-643 (1964)

PÄTAU, K. : Zur statistischen Beurteilungen von Messungsreihen (eine neue t-Tafel), Biol. Zentralblatt 63, 152-168 (1943)

PALEG, L.G. : Physiological effects of gibberellic acid, III. Observations on its mode of action on barley endosperm, Plant Phys. 36, 829-837 (1961)

PALMER, J.M.: The influence of growth regulating substances on the development of enhanced metabolic rates in thin slices of beetroot storage tissue, Plant Phys. 41, 1173-1178 (1966)

PREVOT, P. : Influance de l'hétéroauxine sur la néoformation des bourgéons chez Begonia rex Putz., Bull.Soc.Roy.Sc.de Liège 7, 284(1938)

- - : La néoformation des bourgeons chez les végétaux, Mém.Soc.Roy.Sc.de Liège Sér IV,3,173-342(1939)

- - : Contribution a l'histologie des phénomènes de néoformation chez Begonia rex Putz,, Rev.Sc.(Paris) 87, 275-285 (1948)

- - : Complexité des phénomènes de néoformation de bourgeons chez Begonia rex, Bull.Soc.Bot.France 112, 513-516 (1965)

- - : Perturbation de la polarité par différents colorants chez Begonia rex, Bull.Soc.Bot.France 114, 133-137 (1967a)

- - : Effets de la benzyl adenine chez Begonia rex Putz., C.R.Acad.Agricult.France 17, 1292-1297 (1967b)

- - : Quelques aspects de la faculté de néoformation de bourgeons chez Begonia rex Putz., C.R.Acad.Agricult. France 18, 545-549 (1968)

- - und A. ARNASON: La néoformation de bourgeons par des rondelles de feuilles de Begonia rex, Bull.Soc.Bot.France 113, 216-220 (1966)

- - und A. CHLYAH: L'acide gibberellique, inhibiteur des correlations de néoformation, C.R.Acad.Agricult.France, séance du 18.12.1968 (im Druck)

PURVES, W.K. und W.S. HILLMANN: Experimental separation of gibberellin and auxin actions in etiolated pea epicotyl sections, Physiol. Plant.12, 786-798 (1959)

REGEL, F. : Die Vermehrung der Begoniaceen aus ihren Blättern, Jena.Z.Naturwiss. 10, 447-492 (1876)

REINERT, J. : Wachstum, Fortschritte der Botanik 23, 298-311(305), (1961)

- - und J. BESEMER: Gibberellinsäure, ein Inhibitor morphogenetischer Prozesse, Wiss.Zschr.Univ. Rostock, Mat.-Nat.R. 16, 599-604 (1967)

SACHS, J. : Lehrbuch der Botanik, 4.Auflage, Leipzig (1874)

- - : Über orthotrope und plagiotrope Pflanzentheile, Arbeiten d.Bot.Inst.Würzburg II, 282, Leipzig (1879)

- - : Physiologische Notizen, Flora 75, 1-3 (1892)

SACHS, T. und K.V. THIMANN: Release of lateral buds from apical dominance, Nature 201, 939-940 (1964)

SADIK, S. und J.L. OZBUN: Histochemical changes in the shoot tip of cauliflower during flower induction, Canad.J.Bot. 45, 955-959 (1967)

SCHNEIDER, G.:Eine neue Gruppe von synthetischen Pflanzenwachstumsregulatoren, Naturwiss. 51, 416-417 (1961)

SCHOTT, H. und H. SCHRAUDOLF: Die Wirkung einiger Derivate der 9-Fluorenol-9-carbonsäure auf die Regeneration von Begonienblattscheiben (Begonia rex), Z. Pflanzenphys. 56, 387-396 (1967)

SCHRAUDOLF, H. und J. REINERT: Interaction of plant growth regulators in regeneration processes, Nature 184, 465-466 (1959)

SCOTT, R.A. und J.L. LIVERMAN: Control of etiolated bean leaf disk expansion by gibberellins and adenine, Science 126, 122-123 (1957)

SEITZ, K. und A. LANG: Invertase activity and cell growth in lentil epicotyls, Plant Phys. 43,1075-1082(1968)

SKOOG, F. und C.O. MILLER: Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultivated in vitro, Symp.Soc.Exp.Biol.11,118-131 (1967)

STICHEL, E. : Gleichzeitige Induktion von Sprossen und Wurzeln an in vitro kultivierten Gewebestücken von Cyclamen persicum, Planta 53, 293-317 (1959)

van THIEGEM, P. und H. DOULIOT: Recherches comperatives sur l'origine des membres endogènes dans les plantes vasculaires, Ann Sc. Nat. sér. 7, tome 8 (1888)

THORPE, T.A. und T. MURASHIGE: Starch accumulation in shoot-forming tobacco callus cultures, Science 160, 421-422 (1968)

TOGNONI, F., A.A. de HERTOGH und S.H. WITWER: The independent action of morphactins and gibberellic acid on higher plants, Plant and Cell Phys. 8, 231-239 (1967)

TOPONI, M. : Action combinée de la kinétine et de l'acide indolyacetique sur la néoformation d'organs par les fragments de feuilles d'endive (Cichorium intybus) cultivés in vitro, C.R.Acad.Sci. Paris 257, 3030-3035 (1963)

TORREY, J.G.: Exogenous bud and root formation by isolates roots of Convolvulus grown in vitro, Plant Physiol. 33, 258-263 (1958)

VARNER, J.E.: Gibberellic acid controlled synthesis of α-amylase in barley endosperm, Plant Physiol. 39, 413-415 (1964)

- - und G.R. CHANDRA: Hormonal control of enzyme synthesis in barley endosperm, Proc. Nat. Acad. Sci. 52, 100-106 (1964)

WHEELER, A.W. und E.C. HUMPHRIES: Effect of gibberellic acid on growth, gibberellin content, and chlorophyll content of leaves of potato (Solanum tuberosum), J. Exp. Bot. 14, 132-136 (1963)

WHITE, P.R.: The cultivation of animal and plant cells. Ronald Press, New York (1954)

WIRTH,K. : Experimentelle Beeinflussung der Organbildung an in vitro kultivierten Blattstücken von Begonia rex, Planta 54, 265-293 (1960)

WOLF, F.T. und A.H. HABER: Chlorophyll content of gibberellin-treated wheat seedlings, Nature 186, 217-218 (1960)

WRIGHT, S.T.C.: A sequential growth response to gibberellic acid, kinetin, and indolyl-3-acetic acid in the wheat coleoptile (Triticum vulgare L.), Nature 190, 699-700 (1961)

YUNG, K.H. und J.D.MANN: Inhibition of early steps in the gibberellin-activated synthesis of ∝-amylase, Plant Phys. 42, 195-200 (1967)

ZIEGLER, H., D. KÖHLER und B. STREITZ: Ist 2-Chlor-9-fluorenol-9-carbonsäure ein Gibberellinantagonist?, Z. Pflanzenphys. 54, 118-124 (1966)

Die Arbeit wurde in den Jahren 1965 bis 1969 im Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin durchgeführt. Herrn Professor Dr. J. Reinert danke ich für die Themastellung, ihm und Herrn Privatdozent Dr. H. Clauß für Kritik und Anregung.

Lebenslauf

Ich, Ernst Hermann Münzel wurde am 17. März 1940 als zweiter Sohn des heutigen Rechtsanwalts und Notars Dr. iur. Hermann Münzel und der Ärztin Dr. med. Gertrud Münzel in Berlin-Nikolassee geboren.

Vom Herbst 1946 bis Ostern 1950 besuchte ich die Volksschule in Frankfurt am Main - Fechenheim, anschließend bis Ostern 1959 das altsprachliche Heinrich-von-Gagern-Gymnasium in Frankfurt am Main, wo ich am 27.2.1959 die Reifeprüfung ablegte.

Vom 1.4.1959 bis 31.3.1961 arbeitete ich als Apothekerpraktikant in der Alten Apotheke in Bergen-Enkheim, Kreis Hanau am Main. Am 27.2.1961 bestand ich die pharmazeutische Vorprüfung in Wiesbaden mit „Sehr gut".

Im Sommersemester 1961 begann ich das Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin, wechselte zum Sommersemester 1962 an die Ebehard -Wilhelms-Universität Tübingen über, kehrte zum Sommersemester 1963 an die Freie Universität Berlin zurück und bestand hier am 6.5.1964 die pharmazeutische Prüfung.

Anschließend setzte ich das Studium im Hauptfach Botanik fort und begann mit der Promotionsarbeit. Vom 1.10.1964 bis 30.9.1966 war ich als wiss. Hilfsassistent, vom 1.10.1966 bis 31.3.1968 als wiss. Assistent(m.d.W.b.) am Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin beschäftigt.

Vom 1.4.1968 bis 30.9.1968 arbeitete ich als Kandidat der Pharmazie in der Rathaus-Apotheke in Frankfurt am Main-Fechenheim und erhielt zum 1.10.1968 die Approbation als Apotheker.

Seit 1.10.1968 arbeite ich wieder als wiss. Assistent (m-d.W.b.) am Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin.

Meine akademischen Lehrer waren hauptsächlich im Fach Pharmazie: Prof. G.Schenck(Berlin), Prof.N.Kreutzkamp (Berlin), Prof. Hückel(Tübingen), Prof. Graf(Tübingen) - im Fach Chemie: Prof. Jahr(Berlin), Prof. Manecke(Berlin) - im Fach Hygiene und Medizinische Mikrobiologie: Prof. B.Schmidt (Berlin) - im Fach Botanik: Frau Prof. Ch.Thielke(Berlin), Prof. Th.Eckert(Berlin), Dr. H.Scholz(Berlin), Prof. Mägdefrau(Tübingen), Prof. J. Reinert(Berlin)